(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-70751
(P2012-70751A)
(43)公開日　平成24年4月12日(2012.4.12)

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	ZNAA	2B150
C12N 9/26	(2006.01)	C12N 9/26		4B018
C12N 1/15	(2006.01)	C12N 1/15		4B024
C12N 1/19	(2006.01)	C12N 1/19		4B032
C12N 1/21	(2006.01)	C12N 1/21		4B035

審査請求 有　請求項の数 70　ＯＬ　外国語出願　（全 106 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-258176 (P2011-258176)
(22)出願日　平成23年11月25日 (2011.11.25)
(62)分割の表示　特願2007-519884 (P2007-519884)の分割
原出願日　平成17年7月7日 (2005.7.7)
(31)優先権主張番号　60/608,919
(32)優先日　平成16年7月7日 (2004.7.7)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　10/886,504
(32)優先日　平成16年7月7日 (2004.7.7)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　10/886,505
(32)優先日　平成16年7月7日 (2004.7.7)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　397060588
ダニスコ　エイ／エス
デンマーク国　コペンハーゲン　ケイ　ディーケイ－１００１，ピー．オー．ボックス　１７，ランゲブロガード　１
(71)出願人　595163630
ダニスコ・ユーエス・インコーポレイテッド
Ｄａｎｉｓｃｏ　ＵＳ　Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国９４３０４－１０１３　カリフォルニア州パロ・アルト、ペイジ・ミル・ロード９２５番
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ポリペプチド

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ポリペプチド（詳細にはアミラーゼポリペプチド）およびこれらをコードする核酸、ならびに食品を製造する際の非マルトース生成エキソアミラーゼとしてのそれらの使用法を提供する。
【解決手段】非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチドから誘導可能であるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、特定な配列からなるアミノ酸配列を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して、１２１、１６１、２２３、１４６、１５７、１５８、１９８、２２９、３０３、３０９、３１６、３５３、２６、７０、１４５、１８８、２７２、３３９からなる群から選択される１つ以上の位置でのアミノ酸突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチドから誘導可能であるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して１４６位でのアミノ酸突然変異を含み、該ポリペプチドが、該ＰＳ４改変体ポリペプチドの該親ポリペプチドもしくは野生型ポリペプチドと比較して高い熱安定性もしくは高いエキソ特異性またはその両方を有する、ＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項２】
前記ＰＳ４改変体ポリペプチドがさらに、１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ、１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑ、３５３Ｔ、２６Ｅ、７０Ｄ、１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ、１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａ、３３９Ｅからなる群から選択されるアミノ酸突然変異を含む、請求項１に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項３】
前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、３３位、３４位、１２１位、１３４位、１４１位、１５７位、１６１位、１７８位、１７９位、２２３位、３０７位および３３４位からなる群から選択される１つ以上の突然変異をさらに含む、請求項１または２に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項４】
前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐからなる群から選択される１つ以上の突然変異をさらに含む、請求項１または請求項２または請求項３に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項５】
前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、以下の突然変異：
（ａ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１４６Ｇ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；
（ｂ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｍ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；
（ｃ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１５８Ｔ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；
（ｄ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、１９８Ｗ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；
（ｅ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、２２９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；
（ｆ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、１９８Ｗ、２２３Ｅ、２２９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；
（ｇ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；
（ｈ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０３Ｄ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；
（ｉ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０６Ｔ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；
（ｊ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０６Ｇ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；
（ｋ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；
（ｌ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８

Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３１６Ｓ、および３３４Ｐ；
（ｍ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３１６Ｐおよび３３４Ｐ；
（ｎ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３３４Ｐおよび３５３Ｔ
の各々を含む、請求項１、請求項２または請求項３または請求項４のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項６】
前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、以下の突然変異：
（ａ）Ｎ２６Ｅ、Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ；
（ｂ）Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ７０Ｄ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ；
（ｃ）Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｎ１４５Ｄ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ；
（ｄ）Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ７０Ｄ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｎ１４５Ｄ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ１８８Ｈ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ、Ｗ３３９Ｅ；
（ｅ）Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ７０Ｄ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｎ１４５Ｄ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ１８８Ｓ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ、Ｗ３３９Ｅ；
（ｆ）Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ、Ｗ３３９Ａ；
（ｇ）Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ、Ｗ３３９Ｅ
の各々を含む、請求項１～請求項５のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項７】
前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、８７位における突然変異をさらに含む、請求項１～請求項６のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項８】
前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、突然変異８７Ｓをさらに含む、請求項１～請求項７のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項９】
前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、Ｇ８７Ｓである突然変異をさらに含む、請求項１～請求項８のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項１０】
前記親ポリペプチドが、非マルトース生成エキソアミラーゼを含む、請求項１～請求項９のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項１１】
前記親ポリペプチドが、グルカン１，４－α－マルトテトラヒドロラーゼ（ＥＣ３．２．１．６０）を含む、請求項１～請求項１０のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項１２】

前記親ポリペプチドが、シュードモナス種であるか、またはシュードモナス種から誘導可能である、請求項１～請求項１１のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項１３】
前記親ポリペプチドが、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａもしくはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｔｚｅｒｉであるか、またはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａもしくはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｔｚｅｒｉから誘導可能である、請求項１～請求項１２のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項１４】
前記親ポリペプチドが、配列番号１もしくは配列番号５に示した配列を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ由来の非マルトース生成エキソアミラーゼである、請求項１～請求項１３のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項１５】
配列番号１または配列番号５と少なくとも７５％同一であるアミノ酸配列を有する、請求項１～請求項１４のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項１６】
前記親ポリペプチドが、配列番号７もしくは配列番号１１に示した配列を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｔｚｅｒｉ由来の非マルトース生成エキソアミラーゼである、請求項１～請求項１３のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項１７】
配列番号７または配列番号１１と少なくとも７５％同一であるアミノ酸配列を有する、請求項１～請求項１３または請求項１６のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項１８】
本明細書、請求項または図面に記載の配列を含む、請求項１～請求項１７のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項１９】
ＳＳＭ３８１（配列番号１５）、ＳＡＳ１４０１　Ｌ１０、ＳＡＳ１３８７Ｄ１６　ｂｆ、ｐＭＤ２３６、ｐＭＤ２３７　ｂｆ、ＳＡＳ１３７９　Ｏ１３およびＳＡＳ１３７９　Ｏ９からなる群から選択される配列を含む、請求項１～請求項１８のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項２０】
非マルトース生成エキソアミラーゼ内に存在する１つ以上のドメインを欠失する、請求項１～請求項１９のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項２１】
デンプン結合ドメインを欠失する請求項１～請求項２０のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチドであって、該デンプン結合ドメインが、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ配列の位置の番号付けを参照して４２９位の後のアミノ酸に対応する、ＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項２２】
６０℃における半減期（ｔ１／２）が、前記親ポリペプチドもしくは野生型ポリペプチドと比較して、１５％以上増加している、請求項１～請求項２１のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項２３】
６０℃における半減期（ｔ１／２）が、前記親ポリペプチドもしくは野生型ポリペプチドと比較して、５０％以上増加している、請求項１～請求項２２のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
【請求項２４】
６０℃における半減期（ｔ１／２）が、前記親ポリペプチドもしくは野生型ポリペプチド

と比較して、１００％以上増加している、請求項１～請求項２３のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。

【請求項２５】

前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、前記親ポリペプチドもしくは前記野生型ポリペプチドと比較して、１０％以上のエキソ特異性を有する、請求項１～請求項２４のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。

【請求項２６】

前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、前記親ポリペプチドもしくは前記野生型ポリペプチドと比較して、２０％以上のエキソ特異性を有する、請求項１～請求項２５のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。

【請求項２７】

前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、前記親ポリペプチドもしくは前記野生型ポリペプチドと比較して、５０％以上のエキソ特異性を有する、請求項１～請求項２６のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。

【請求項２８】

請求項１～請求項２７のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチドの少なくとも２０個の残基のフラグメントを含むポリペプチドであって、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有するポリペプチド。

【請求項２９】

請求項１～請求項２８のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド配列の１つ以上の残基での突然変異によって該ＰＳ４改変体ポリペプチドから誘導可能であるポリペプチドであって、該ＰＳ４改変体ポリペプチドの前記親ポリペプチドもしくは野生型ポリペプチドと比較してより高い熱安定性もしくはより高いエキソ特異性またはその両方を有するポリペプチド。

【請求項３０】

請求項１～請求項２９のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチドの、食品または飼料添加物としての使用。

【請求項３１】

デンプンを処理するためのプロセスであって、該デンプンを請求項１～請求項２９のいずれか１項に記載のポリペプチドと接触させる工程と、該ポリペプチドに該デンプンから１種以上の直鎖状生成物を生成させる工程とを包含するプロセス。

【請求項３２】

食品または飼料製品を調製する際の請求項１～請求項２９のいずれか１項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項３３】

食品または飼料製品を調製するプロセスであって、請求項１～請求項２９のいずれか１項に記載のポリペプチドを食品の成分または飼料の成分と混合する工程を包含するプロセス。

【請求項３４】

前記食品が生地もしくは生地製品、好ましくは加工された生地製品を含む、請求項３２に記載の使用、または請求項３３に記載のプロセス。

【請求項３５】

前記食品がベーカリー製品である、請求項３０～請求項３４のいずれか１項に記載の使用またはプロセス。

【請求項３６】

ベーカリー製品を製造するためのプロセスであって：（ａ）デンプン媒質を提供する工程と；（ｂ）該デンプン媒質に請求項１～請求項２９のいずれか１項に記載のポリペプチドを添加する工程と；（ｃ）ベーカリー製品を製造するために工程（ｂ）の間または工程（ｂ）の後に該デンプン媒質に熱を加える工程と、を包含するプロセス。

【請求項３７】

請求項３２～請求項３６のいずれか１項に記載のプロセスによって得られる食品、飼料製品、生地製品またはベーカリー製品。

【請求項３８】

生地のための改善剤組成物であって、請求項１～請求項２９のいずれか１項に記載のポリペプチド、および少なくとも１種のさらなる生地成分もしくは生地添加物を含有する、改善剤組成物。

【請求項３９】

粉および請求項１～請求項２９のいずれか１項に記載のポリペプチドを含有する組成物。

【請求項４０】

生地製品において、該生地製品の硬化を遅延もしくは減少させ、好ましくは有害な老化を遅延もしくは減少させるための、請求項１～請求項３９のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチドの使用。

【請求項４１】

請求項１～請求項４０のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチドと、Ｎｏｖａｍｙｌ、またはマルトース生成αアミラーゼ活性を有するＮｏｖａｍｙｌの改変体、ホモログ、または突然変異体との組み合わせ。

【請求項４２】

請求項１～請求項４１のいずれか１項に記載の用途のための請求項４１に記載の組み合わせの使用。

【請求項４３】

請求項４１に記載の組み合わせを用いた処理によって製造された食品または飼料製品。

【請求項４４】

請求項１～請求項２９のいずれか１項に記載のポリペプチドをコード可能である核酸。

【請求項４５】

配列番号６または配列番号１２と少なくとも７５％同一である核酸配列を有する、請求項４４に記載の核酸。

【請求項４６】

非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有するポリペプチドをコード可能である、請求項４０または請求項４５に記載の核酸の少なくとも６０残基のフラグメントを含む核酸。

【請求項４７】

親配列から誘導可能である核酸配列であって、該親配列が非マルトース生成エキソアミラーゼをコード可能であり、該核酸配列は、該核酸が配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して特定された１４６位における突然変異をコードするように１つ以上の残基において置換を含み、該核酸によってコードされる該ポリペプチドが、該親配列もしくは野生型配列によってコードされるポリペプチドと比較して高い熱安定性もしくは高いエキソ特異性またはその両方を有する、核酸配列。

【請求項４８】

請求項４７に記載の核酸配列であって、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して特定された位置における以下の突然変異、１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ、１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑ、３５３Ｔ、２６Ｅ、７０Ｄ、１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ、１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａ、３３９Ｅの１つ以上をコードするように１つ以上の残基において置換を含む、核酸配列。

【請求項４９】

１つ以上のヌクレオチド残基の置換によって非マルトース生成エキソアミラーゼをコードする親配列から誘導される、請求項４４～請求項４８のいずれか１項に記載のＰＳ４核酸配列。

【請求項５０】
請求項４４～請求項４９のいずれか１項に記載のＰＳ４核酸を含むプラスミド。
【請求項５１】
請求項４４～請求項５０のいずれか１項に記載のＰＳ４核酸を含むか、または請求項１～請求項２９のいずれか１項に記載のポリペプチドを発現可能である発現ベクター。
【請求項５２】
請求項５０に記載のプラスミドまたは請求項５１に記載の発現ベクターを含む宿主細胞であって、好ましくは該プラスミドまたは該発現ベクターを用いて形質転換されている宿主細胞。
【請求項５３】
請求項１～請求項２９のいずれか１項に記載のポリペプチドを発現可能である細胞。
【請求項５４】
細菌細胞、真菌細胞または酵母細胞である、請求項５２に記載の宿主細胞、または請求項５３に記載の細胞。
【請求項５５】
ＰＳ４改変体ポリペプチドを発現する方法であって、請求項５２、請求項５３または請求項５４に記載の宿主細胞もしくは細胞を得る工程と、該細胞もしくは該宿主細胞から該ポリペプチドを発現させる工程と、および必要に応じて該ポリペプチドを精製する工程と、を包含する方法。
【請求項５６】
非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチド内に（配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して）、１４６位にアミノ酸置換を導入する工程によってポリペプチドの配列を変化させる方法であって、該変化させたポリペプチドが、該親配列もしくは野生型配列によってコードされるポリペプチドと比較して高い熱安定性もしくは高いエキソ特異性またはその両方を有する、方法。
【請求項５７】
さらに、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチド内に（配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して）、１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ、１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ，１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑ、３５３Ｔ、２６Ｅ、７０Ｄ、１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ，１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａ、および、３３９Ｅからなる群から選択されるアミノ酸置換を導入する工程による、請求項５６に記載のポリペプチドの配列を変化させる方法。
【請求項５８】
配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して、１４６位に置換を導入する工程によって非マルトース生成エキソアミラーゼの配列を変化させる方法であって、該変化させた非マルトース生成エキソアミラーゼが、親配列もしくは野生型配列によってコードされるポリペプチドと比較して高い熱安定性もしくは高いエキソ特異性またはその両方を有する、方法。
【請求項５９】
さらに、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して、１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ、１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ，１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑ、３５３Ｔ、２６Ｅ、７０Ｄ、１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ，１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａ、および、３３９Ｅからなる群から選択される置換を導入する工程による、請求項５８に記載の非マルトース生成エキソア

ミラーゼの配列を変化させる方法。

【請求項６０】

前記非マルトース生成エキソアミラーゼの配列が非マルトース生成エキソアミラーゼをコードする核酸の配列を変化させる工程によって変化させられる、請求項５６または５９に記載の方法。

【請求項６１】

ＰＳ４改変体ポリペプチドを製造する方法であって、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチド内にアミノ酸置換を導入する工程であって、該アミノ酸置換が配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して１４６位であり、該製造されたＰＳ４ポリペプチドが、親配列もしくは野生型配列によてコードされるポリペプチドと比較して高い熱安定性もしくは高いエキソ特異性またはその両方を有する、方法。

【請求項６２】

請求項６１に記載のＰＳ４改変体ポリペプチドを製造する方法であって、さらに、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチド内にアミノ酸置換を導入する工程を包含し、該アミノ酸置換が配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して、１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ、１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑ、３５３Ｔ、２６Ｅ、７０Ｄ、１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ、１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａ、３３９Ｅからなる群から選択される、方法。

【請求項６３】

前記親ポリペプチドをコードする核酸の配列が前記アミノ酸置換を導入するように変化させられる、請求項６０、６１または６２に記載の方法。

【請求項６４】

非マルトース生成エキソアミラーゼをコードする核酸配列を変化させる方法であって、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して、１４６位のアミノ酸残基をコードするコドンを該配列に導入する工程を、包含し、該核酸によってコードされる該ポリペプチドが、親配列もしくは野生型配列によってコードされるポリペプチドと比較して高い熱安定性もしくは高いエキソ特異性またはその両方を有する、方法。

【請求項６５】

請求項６４に記載の非マルトース生成エキソアミラーゼをコードする核酸配列を変化させる方法であって、該方法は、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して、１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ、１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑ、３５３Ｔ、２６Ｅ、７０Ｄ、１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ、１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａ、および、３３９Ｅからなる群から選択されるアミノ酸残基をコードするコドンを該配列に導入する工程をさらに包含する、方法。

【請求項６６】

ポリペプチドの熱安定性、もしくはエキソ特異性、またはその両方を増加させる方法であって、請求項５４～請求項６５のいずれか１項に記載の工程を包含する方法。

【請求項６７】

前記ポリペプチドが単離されるかもしくは精製される、または単離されかつ精製される、請求項５４～請求項６６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６８】

請求項５４～請求項６７のいずれか１項に記載の方法によって得られ得るポリペプチド。

【請求項６９】
請求項５４～請求項６８のいずれか１項に記載の方法によって得られたポリペプチド。
【請求項７０】
実質的に、添付の図面を参考として上述しそして添付の図面に示した通りである、ＰＳ４改変体ポリペプチド、使用、プロセス、食品、飼料製品、生地製品、ベーカリー製品、改善剤組成物、組成物、核酸、ベクターもしくは宿主細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
２００３年７月７日に出願された米国仮特許出願第６０／４８５，４１３号、同第６０／４８５，５３９号、および同第６０／４８５，６１６号に対する参照がなされる。また、２００４年７月７日に出願された国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ２００４／０２１７２３およびＰＣＴ／ＵＳ２００４／０２７１３９（出願人：Ｇｅｎｅｎｃｏｒ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ）に対する参照もまた、なされる。やはり２００４年７月７日に出願された米国特許出願第１０／８８６，９０５号および同第１０／８６６，９０３号に対する参照もまた、なされる。
【０００２】
米国仮特許出願第６０／６０８，９１９号（米国特許出願第１０，８８７，０５６号として２００４年７月７日に出願されたが、２００４年９月１５日に仮特許出願に変更された）に対する参照もまた、なされる。２００４年９月２２日に出願された米国仮特許出願第６０／６１２，４０７号に対する参照もまた、なされる。
【０００３】
２００３年７月７日に出願された米国仮特許出願第６０／４８５，５３９号に対する参照が、さらになされる。また、２００４年７月７日に出願され、米国を指定する国際特許出願ＰＣＴ／ＩＢ２００４／００２４８７（出願人：Ｄａｎｉｓｃｏ　Ａ／Ｓ）に対する参照もまた、なされる。２００４年７月７日に出願された米国特許出願第１０／８８６，０２３号に対する参照もまた、なされる。
【０００４】
２００４年７月７日に出願された米国特許出願第１０／８８６，５０５号、同第１０／８８６，５２７号、および同第１０／８８６，５０４号に対する参照もまた、なされる。また、２００４年９月２２日に出願された米国特許出願第１０／９４７，６１２号に対する参照もまた、なされる。
【０００５】
上記の出願、および上記出願各々の係属中を含めて各特許および上記出願において引用されるかもしくは参照される各記載（「出願および文献によって引用される記載」）、ならびに上記出願および文献の各々においてそして上記出願および文献によって引用される記載のいずれかにおいて、引用されたかもしくは言及された任意の製品についての任意の製造業者の指示もしくはカタログは、本明細書中で参考として援用される。さらに、本明細書中で引用される全ての記載、および本明細書中で引用される記載において引用される全ての記載および参考文献、ならびに本明細書中および本明細書中で援用される任意の記載において引用されるかもしくは言及される任意の製品についての任意の製造業者の指示もしくはカタログは、本明細書中で参考として援用される。本明細書中で参考として援用される記載、もしくはこれらの記載における任意の教示は、本発明の実施において使用され得る。本明細書中に参考として援用される記載は、先行技術として認められるものではない。
【０００６】
（分野）
本発明は、ポリペプチド（詳細にはアミラーゼポリペプチド）およびこれらをコードする核酸、ならびに食品を製造する際の非マルトース生成エキソアミラーゼとしてのそれらの使用に関する。本発明のアミラーゼは、より有益な品質を有するように操作されている

。具体的には、本発明のアミラーゼは、変化したエキソ特異性および／または変化した熱安定性を示す。特に、本ポリペプチドは、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性（特にグルカン１，４－α－マルトテトラヒドロラーゼ（ＥＣ３．２．１．６０）活性）を有するポリペプチドに由来する。

【背景技術】

【０００７】

（背景）

改善されたアミラーゼは、ベーキング（ｂａｋｉｎｇ）などの所定のプロセスに固有の問題を改善できる。アミロペクチンの結晶化は、ベーキングから数日後にデンプン顆粒中で発生するが、これはパンの堅さ増加をもたらし、パンの硬化（ｓｔａｌｉｎｇ）を引き起こす。パンが硬化すると、パンはクラム（ｃｒｕｍｂ）の柔らかさやクラムの水分を失う。結果として、クラムの弾性が低下し、パンは革のようなクラスト（ｃｒｕｓｔ）になる。

【０００８】

アミロペクチン側鎖の（例えば、アミラーゼによる）酵素加水分解は、結晶化を減少させ、硬化防止性を増加させることができる。結晶化は、アミロペクチン側鎖の長さに左右される：側鎖が長いほど、結晶化が大きくなる。ほとんどのデンプン顆粒は２種のポリマーであるアミロペクチンとアミロースの混合物から構成されるが、それらの約７５％はアミロペクチンである。アミロペクチンは、（１－４）結合によって連結されたα－Ｄ－グルコピラノシル単位の鎖からなる極めて大きな分枝状分子であり、ここで、鎖はα－Ｄ－（１－６）結合によって結合されて分枝鎖を形成している。アミロースは、α－Ｄ－（１－６）分枝鎖をほとんど有していない（１－４）結合α－Ｄ－グルコピラノシル単位の直鎖である。

【０００９】

白パン、ふるいにかけたライ麦粉と小麦粉とから作ったパンおよびロールパンなどのデンプン質のパン製品のベーキングは、約１５～６０分間にわたり１８０～２５０℃の範囲内の温度のオーブンでパン生地をベーキングすることによって遂行される。ベーキングプロセスの間には、急激な（２００℃から１２０℃への）温度勾配が外側生地層全体に広がり、そこにベーキング製品のクラストが発生する。しかしクラム中の温度は、蒸気のためにベーキングプロセスの終了時においても約１００℃に過ぎない。約８５℃の温度を超えると酵素不活性化が発生するので、酵素は硬化防止特性を示さないであろう。そこで、ベーキング中にデンプンを効率的に変性させられるのは熱安定性アミラーゼだけである。

【００１０】

エンドアミラーゼ活性は、分枝状デキストリンの蓄積に起因する粘着性もしくはゴム状のクラムを生じさせることによって最終パン製品の品質に有害な影響を及ぼす可能性がある。エキソアミラーゼ活性が好ましいのは、エンドアミラーゼ活性に伴う有害な作用が少なく、硬化の遅延をもたらすデンプンの所望の変性を遂行するためである。エンドアミラーゼ活性の減少は、分枝状デキストリンを減少させてより高品質のパンを生成し得る、より大きなエキソ特異性を導くことができる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１１】

（概要）

本発明者らは、本発明によって、特許請求の範囲に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドを提供する。本発明者らは、特許請求の範囲に記載した食品添加物、食品、ベーカリー製品、改善剤組成物、動物用飼料を含む飼料製品としてのＰＳ４改変体ポリペプチドの使用、およびそれらに含まれるＰＳ４改変体ポリペプチドの使用をさらに提供する。本発明者らは、特許請求の範囲に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドをコードする核酸、およびそれらに関連する核酸を提供する。当該のＰＳ４改変体ポリペプチドを生成する方法ならびに本発明の他の態様もまた特許請求の範囲に記載されている。

【００１２】

（配列表）

配列番号１は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列に由来するＰＳ４参照配列を示している。配列番号２は、ＰＳａｃ－Ｄ３４配列；１１の置換およびデンプン結合ドメインの欠失を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号３は、ＰＳａｃ－Ｄ２０配列；１３の置換およびデンプン結合ドメインの欠失を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号４は、ＰＳａｃ－Ｄ１４配列；１４の置換およびデンプン結合ドメインの欠失を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号５は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ由来グルカン１，４－α－マルトテトラヒドロラーゼ前駆物質（ＥＣ３．２．１．６０）（Ｇ４－アミラーゼ）（マルトテトラオース生成アミラーゼ）（エキソ－マルトテトラヒドロラーゼ）（マルトテトラオース生成エキソアミラーゼ）を示している。ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ２２９６３。配列番号６は、マルトテトラヒドロラーゼ（ＥＣ番号＝３．２．１．６０）をコードするＰ．ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ　ｍｔａ遺伝子を示している。ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｘ１６７３２。配列番号７は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列に由来するＰＳ４参照配列を示している。配列番号８は、ＰＳｔｕ－Ｄ３４配列；９つの置換を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号９は、ＰＳｔｕ－Ｄ２０配列；１１の置換を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ由来マルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号１０は、ＰＳｔｕ－Ｄ１４配列；１２の置換を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ由来マルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号１１は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｅｒｆｅｃｔｏｍａｒｉｎａ）グルカン１，４－α－マルトテトラヒドロラーゼ前駆物質（ＥＣ３．２．１．６０）（Ｇ４－アミラーゼ）（マルトテトラオース生成アミラーゼ）（エキソ－マルトテトラヒドロラーゼ）（マルトテトラオース生成エキソアミラーゼ）を示している。ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ１３５０７。配列番号１２は、Ｐ．ｓｔｕｚｅｒｉマルトテトラオース生成アミラーゼ（ａｍｙＰ）遺伝子、完全コドンを示している。ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｍ２４５１６。配列番号１３は、ｐＭＤ５５配列；１１の置換（Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ、Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９ＴおよびＧ１２１Ｆ）を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号１３は、ｐＭＤ５５配列；１１の置換（Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ、Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９ＴおよびＧ１２１Ｆ）およびデンプン結合ドメインの欠失を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号１３は、ｐＭＤ５５配列；１１の置換（Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ、Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９ＴおよびＧ１２１Ｆ）を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号１３は、ｐＭＤ５５配列；１１の置換（Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ、Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９ＴおよびＧ１２１Ｆ）およびデンプン結合ドメインの欠失を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号１４は、ＰＭＤ９６配列；Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｈ３０７ＬおよびＳ３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を

示している。配列番号１５は、ＳＳＭ３８１配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１４６Ｇ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号１６は、ＳＳＭ２７９Ｂ1配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｍ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号１７は、ＳＳＭ２３７Ｐ２配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１５８Ｔ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号１８は、３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、１９８Ｗ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号１９は、ＳＳＭ３２５Ｆ３配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、２２９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号２０は、ｐＭＤ１２９配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、１９８Ｗ、２２３Ｅ、２２９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号２１は、ＳＳＭ３４１Ａ9配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号２２は、ＳＳＭ３４１Ｇ１１配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０３Ｄ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号２３は、ＳＳＭ３５０Ｂ１１配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０６Ｔ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号２４は、ＳＳＭ３５０Ｃ１２配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０６Ｇ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号２５は、ＳＳＭ３３２Ｑ４配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号２６は、ＳＳＭ３６５Ｂ４配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３１６Ｓ、および３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号２７は、ＳＳＭ３６５Ｆ４配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３１６Ｐおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。配列番号２８は、ＳＳＭ３６０Ｃ7配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３３４Ｐおよび３５３Ｔでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍ

ｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列を示している。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目１)

非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチドから誘導可能であるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して１２１、１６１、２２３、１４６、１５７、１５８、１９８、２２９、３０３、３０６、３０９、３１６、３５３、２６、７０、１４５、１８８、２７２、３３９からなる群から選択される１つ以上の位置でのアミノ酸突然変異を含む、ＰＳ４改変体ポリペプチド。

(項目２)

前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ、１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑ、３５３Ｔ、２６Ｅ、７０Ｄ、１１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ、１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａ、３３９Ｅからなる群から選択されるアミノ酸突然変異を含む、項目１に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。

(項目３)

前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、３３位、３４位、１２１位、１３４位、１４１位、１５７位、１６１位、１７８位、１７９位、２２３位、３０７位および３３４位からなる群から選択される１つ以上の突然変異であって、好ましくは３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐからなる群から選択される突然変異をさらに含む、項目１または項目２に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。

(項目４)

前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、以下の突然変異：

（ａ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１４６Ｇ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；

（ｂ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｍ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；

（ｃ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１５８Ｔ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；

（ｄ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、１９８Ｗ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；

（ｅ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、２２９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；

（ｆ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、１９８Ｗ、２２３Ｅ、２２９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；

（ｇ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；

（ｈ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０３Ｄ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；

（ｉ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０６Ｔ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；

（ｊ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０６Ｇ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；

（ｋ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐ；

（ｌ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３１６Ｓ、および３３４Ｐ；

（ｍ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３１６Ｐおよび３３４Ｐ；

（ｎ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３３４Ｐおよび３５３Ｔ

（の各々を含む、項目１、項目２または項目３のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。

(項目５）

前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、以下の突然変異：

（ａ）Ｎ２６Ｅ、Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ；

（ｂ）Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ７０Ｄ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ；

（ｃ）Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｎ１４５Ｄ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ；

（ｄ）Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ７０Ｄ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｎ１４５Ｄ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ１８８Ｈ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ、Ｗ３３９Ｅ；

（ｅ）Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ７０Ｄ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｎ１４５Ｄ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ１８８Ｓ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ、Ｗ３３９Ｅ；

（ｆ）Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ、Ｗ３３９Ａ；

（ｇ）Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ、Ｗ３３９Ｅ

の各々を含む、項目１～項目４のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。

(項目６）

前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、８７位における突然変異であって、好ましくは８７Ｓであり、より好ましくはＧ８７Ｓである突然変異をさらに含む、項目１～項目５のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。

(項目７）

前記親ポリペプチドが、非マルトース生成エキソアミラーゼ、好ましくはグルカン１，４－α－マルトテトラヒドロラーゼ（ＥＣ３．２．１．６０）を含む、項目１～項目６のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。

(項目８）

前記親ポリペプチドが、シュードモナス種、好ましくはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａもしくはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉであるか、またはシュードモナス種から、好ましくはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａもしくはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉから誘導可能である、項目１～項目７のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。

(項目９）

前記親ポリペプチドが、配列番号１もしくは配列番号５に示した配列を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ由来の非マルトース生成エキソアミラーゼである、項目１～項目８のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。

(項目１０)
配列番号１または配列番号５と少なくとも７５％同一であるアミノ酸配列を有する、項目１～項目９のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
(項目１１)
前記親ポリペプチドが、配列番号７もしくは配列番号１１に示した配列を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ由来の非マルトース生成エキソアミラーゼである、項目１～項目８のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
(項目１２)
配列番号７または配列番号１１と少なくとも７５％同一であるアミノ酸配列を有する、項目１～項目８または項目１１のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
(項目１３)
本明細書、項目または図面に記載の配列を含む、項目１～項目１２のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
(項目１４)
ＰＳａｃ－Ｄ３４（配列番号２）、ＰＳａｃ－Ｄ２０（配列番号３）、ＰＳａｃ－Ｄ１４（配列番号４）、ＰＳｔｕ－Ｄ３４（配列番号８）、ＰＳｔｕ－Ｄ２０（配列番号９）、ＰＳｔｕ－Ｄ１４（配列番号１０）、ｐＭＤ５５（配列番号１３）、ｐＭＤ９６（配列番号１４）、ＳＳＭ３８１（配列番号１５）、ＳＳＭ２７９　Ｂ１（配列番号１６）、ＳＳＭ２３７Ｐ２（配列番号１７）、配列番号１８、ＳＳＭ３２５Ｆ３（配列番号１９）、ｐＭＤ１２９（配列番号２０）、ＳＳＭ３４１Ａ９（配列番号２１）、ＳＳＭ３４１Ｇ１１（配列番号２２）、ＳＳＭ３５０Ｂ１１（配列番号２３）、ＳＳＭ３５０Ｃ１２（配列番号２４）、ＳＳＭ３３２Ｑ４（配列番号２５）、ＳＳＭ３６５Ｂ４（配列番号２６）、ＳＳＭ３６５Ｆ４（配列番号２７）およびＳＳＭ３６０Ｃ７（配列番号２８）、ＳＳＭ２１９Ｂ３、ＳＡＳ１４０１Ｌ１０、ＳＡＳ１３８７Ｄ１６ｂｆ、ｐＭＤ２３６、ｐＭＤ２３７ｂｆ、ＳＡＳ１３７９Ｏ１３およびＳＡＳ１３７９Ｏ９からなる群から選択される配列を含む、項目１～項目１３のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
(項目１５)
前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、同一条件下で試験した場合に前記親ポリペプチドもしくは野生型ポリペプチドと比較して高い熱安定性を有する、項目１～項目１４のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
(項目１６)
半減期（ｔ１／２）であって、好ましくは６０℃における半減期が、前記親ポリペプチドもしくは野生型ポリペプチドと比較して、１５％以上、好ましくは５０％以上、最も好ましくは１００％以上増加している、項目１～項目１５のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
(項目１７)
同一条件下で試験した場合に前記親ポリペプチドもしくは野生型ポリペプチドと比較して高いエキソ特異性を有する、項目１～項目１６のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
(項目１８)
前記ＰＳ４改変体ポリペプチドが、前記親ポリペプチドもしくは前記野生型ポリペプチドと比較して、１０％以上、好ましくは２０％以上、好ましくは５０％以上のエキソ特異性を有する、項目１～項目１７のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド。
(項目１９)
項目１～項目１８のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチドの少なくとも２０個の残基のフラグメントを含むポリペプチドであって、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有するポリペプチド。
(項目２０)
項目１～項目１９のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチド配列の１つ以上の残基での突然変異によって該ＰＳ４改変体ポリペプチドから誘導可能であるポリペプチドで

あって、該ＰＳ４改変体ポリペプチドの前記親ポリペプチドもしくは野生型ポリペプチドと比較してより高い熱安定性もしくはより高いエキソ特異性またはその両方を有するポリペプチド。
(項目２１)
項目１～項目２０のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチドの、食品または飼料添加物としての使用。
(項目２２)
デンプンを処理するためのプロセスであって、該デンプンを項目１～項目２０のいずれか１項に記載のポリペプチドと接触させる工程と、該ポリペプチドに該デンプンから１種以上の直鎖状生成物を生成させる工程とを包含するプロセス。
(項目２３)
食品または飼料製品を調製する際の項目１～項目２０のいずれか１項に記載のポリペプチドの使用。
(項目２４)
食品または飼料製品を調製するプロセスであって、項目１～項目２０のいずれか１項に記載のポリペプチドを食品の成分または飼料の成分と混合する工程を包含するプロセス。
(項目２５)
該食品が生地もしくは生地製品、好ましくは加工された生地製品を含む、項目２３に記載の使用、または項目２４に記載のプロセス。
(項目２６)
該食品がベーカリー製品である、項目２１～項目２５のいずれか１項に記載の使用またはプロセス。
(項目２７)
ベーカリー製品を製造するためのプロセスであって：（ａ）デンプン媒質を提供する工程と；（ｂ）該デンプン媒質に項目１～項目２０のいずれか１項に記載のポリペプチドを添加する工程と；（ｃ）ベーカリー製品を製造するために工程（ｂ）の間または工程（ｂ）の後に該デンプン媒質に熱を加える工程と、を包含するプロセス。
(項目２８)
項目２３～項目２７のいずれか１項に記載のプロセスによって得られる食品、飼料製品、生地製品またはベーカリー製品。
(項目２９)
生地のための改善剤組成物であって、項目１～項目２０のいずれか１項に記載のポリペプチド、および少なくとも１種のさらなる生地成分もしくは生地添加物を含有する、改善剤組成物。
(項目３０)
粉および項目１～項目２０のいずれか１項に記載のポリペプチドを含有する組成物。
(項目３１)
生地製品において、該生地製品の硬化を遅延もしくは減少させ、好ましくは有害な老化を遅延もしくは減少させるための、項目１～項目３０のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチドの使用。
(項目３２)
項目１～項目３１のいずれか１項に記載のＰＳ４改変体ポリペプチドと、Ｎｏｖａｍｙｌ、またはマルトース生成αアミラーゼ活性を有するＮｏｖａｍｙｌの改変体、ホモログ、または突然変異体との組み合わせ。
(項目３３)
項目１～項目３２のいずれか１項に記載の用途のための項目３２に記載の組み合わせの使用。
(項目３４)
項目３２に記載の組み合わせを用いた処理によって製造された食品または飼料製品。
(項目３５)

項目１～項目２０のいずれか１項に記載のポリペプチドをコード可能である核酸。
（項目３６）
配列番号６または配列番号１２と少なくとも７５％同一である核酸配列を有する、項目３５に記載の核酸。
（項目３７）
非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有するポリペプチドをコード可能である、項目３５または項目３６に記載の核酸の少なくとも６０残基のフラグメントを含む核酸。
（項目３８）
親配列から誘導可能である核酸配列であって、該親配列が非マルトース生成エキソアミラーゼをコード可能であり、該核酸配列は、該核酸が配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して特定された位置における以下の突然変異：（ａ）１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ；（ｂ）１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑ、３５３Ｔ；および（ｃ）２６Ｅ、７０Ｄ、１１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ、１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａ、３３９Ｅの１つ以上をコードするように１つ以上の残基において置換を含む、核酸配列。
（項目３９）
１つ以上のヌクレオチド残基の置換によって非マルトース生成エキソアミラーゼをコードする親配列から誘導される、項目３５～項目３８のいずれか１項に記載のＰＳ４核酸配列。
（項目４０）
項目３５～項目３９のいずれか１項に記載のＰＳ４核酸を含むプラスミド。
（項目４１）
項目３５～項目４０のいずれか１項に記載のＰＳ４核酸を含む発現ベクター、または項目１～項目２０のいずれか１項に記載のポリペプチドを発現可能である発現ベクター。
（項目４２）
項目４０に記載のプラスミドまたは項目４１に記載の発現ベクターを含む宿主細胞であって、好ましくは該プラスミドまたは該発現ベクターを用いて形質転換されている宿主細胞。
（項目４３）
項目１～項目２０のいずれか１項に記載のポリペプチドを発現可能である細胞。
（項目４４）
細菌細胞、真菌細胞または酵母細胞である、項目４２に記載の宿主細胞、または項目４３に記載の細胞。
（項目４５）
ＰＳ４改変体ポリペプチドを発現する方法であって、項目４２、項目４３または項目４４に記載の宿主細胞もしくは細胞を得る工程と、該細胞もしくは該宿主細胞から該ポリペプチドを発現させる工程と、および必要に応じて該ポリペプチドを精製する工程と、を包含する方法。
（項目４６）
非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチド内に、（配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して）（ａ）１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ；（ｂ）１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑ、３５３Ｔ；および（ｃ）２６Ｅ、７０Ｄ、１１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ、１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａ、３３９Ｅからなる群から選択されるアミノ酸置換を導入する工程によってポリペプチドの配列を変化させる方法。
（項目４７）

配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して（ａ）１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ；（ｂ）１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑ、３５３Ｔ；および（ｃ）２６Ｅ、７０Ｄ、１１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ、１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａ、３３９Ｅからなる群から選択される置換を導入する工程によって非マルトース生成エキソアミラーゼの配列を変化させる方法。

(項目４８)

非マルトース生成エキソアミラーゼの配列が非マルトース生成エキソアミラーゼをコードする核酸の配列を変化させる工程によって変化させられる、項目４６または４７に記載の方法。

(項目４９)

ＰＳ４改変体ポリペプチドを製造する方法であって、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチド内にアミノ酸置換を導入する工程であって、該アミノ酸置換が配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して（ａ）１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ；（ｂ）１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑ、３５３Ｔ；および（ｃ）２６Ｅ、７０Ｄ、１１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ、１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａ、３３９Ｅからなる群から選択される工程を包含する方法。

(項目５０)

前記親ポリペプチドをコードする核酸の配列が前記アミノ酸置換を導入するように変化させられる、項目４８または４９に記載の方法。

(項目５１)

非マルトース生成エキソアミラーゼをコードする核酸配列を変化させる方法であって、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して（ａ）１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ；（ｂ）１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑ、３５３Ｔ；および（ｃ）２６Ｅ、７０Ｄ、１１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ、１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａ、３３９Ｅからなる群から選択されるアミノ酸残基をコードするコドンを該配列に導入する工程を、包含する方法。

(項目５２)

ポリペプチドの熱安定性、もしくはエキソ特異性、またはその両方を増加させる方法であって、項目４４～項目５１のいずれか１項に記載の工程を包含する方法。

(項目５３)

前記ポリペプチドが単離されるかもしくは精製される、または単離されかつ精製される、項目４４～項目５２のいずれか１項に記載の方法。

(項目５４)

項目４４～項目５３のいずれか１項に記載の方法によって得られ得るポリペプチド。

(項目５５)

項目４４～項目５４のいずれか１項に記載の方法によって得られたポリペプチド。

(項目５６)

実質的に、添付の図面を参考として上述しそして添付の図面に示した通りである、ＰＳ４改変体ポリペプチド、使用、プロセス、食品、飼料製品、生地製品、ベーカリー製品、改善剤組成物、組成物、核酸、ベクターもしくは宿主細胞。

【発明を実施するための形態】

【００１３】
（詳細な説明）
以下の説明および実施例では、文脈が他のことを指示しない限り、ＰＳ４改変体ポリペプチドの用量は、粉のｐｐｍ（１００万分の１ｇ）で示される。例えば、表２に使用した「１　Ｄ３４」は、重量／重量ベースでｐＳａｃ－Ｄ３４の１ｐｐｍを指示している。好ましくは、酵素の量は、Ｂｒａｄｆｏｒｄ（１９７６，Ａ　ｒａｐｉｄ　ａｎｄ　ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ　ｍｅｔｈｏｄ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｍｉｃｒｏｇｒａｍ　ｑｕａｎｔｉｔｉｅｓ　ｏｆ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｕｔｉｌｉｚｉｎｇ　ｔｈｅ　ｐｒｉｎｃｉｐｌｅ　ｏｆ　ｐｒｏｔｅｉｎ－ｄｙｅ　ｂｉｎｄｉｎｇ．Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７２：２４８－２５４）に記載されたアッセイを用いて、標準物質としてウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を用いて測定した活性アッセイに基づいて純粋酵素タンパク質の当量として決定される。
【００１４】
生成された、または本明細書によって含まれることが企図されている様々なＰＳ４改変体ポリペプチド改変体を記載する際には、容易な参照のために以下の用語法を採用する：
（ｉ）置換が数字および文字（例えば１４１Ｐ）を含む場合は、これは［番号付けシステムにしたがった位置／置換アミノ酸］を意味する。したがって、例えば、１４１位における１つのアミノ酸のプロリンへの置換は１４１Ｐと指定される；
（ｉｉ）置換が文字、数字および文字（例えばＡ１４１Ｐ）を含む場合は、これは［元のアミノ酸／番号付けシステムにしたがった位置／置換アミノ酸］を意味する。したがって、例えば、１４１位におけるアラニンのプロリンによる置換はＡ１４１Ｐと指定される。
【００１５】
２つ以上の可能な置換基が特定の位置で存在可能である場合は、これは必要に応じてスラッシュマーク「／」によって分離される連続する文字（例えば、Ｇ３０３ＥＤもしくはＧ３０３Ｅ／Ｄ）によって指定されるであろう。１つの位置の関連アミノ酸を任意のアミノ酸で置換できる場合は、これは［番号付けシステムにしたがった位置／Ｘ］、例えば１２１Ｘによって指定される。
【００１６】
複数の突然変異はスラッシュマーク「／」によって分離することによって指定することができ、例えばＡ１４１Ｐ／Ｇ２２３Ａは、アラニンがプロリンでそしてグリシンがアラニンで各々置換されている、１４１位および２２３位における突然変異を表している。
【００１７】
本明細書で他に規定しない限り、本明細書で使用したすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって共通して理解されている意味と同一の意味を有する。Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ，ら，ＤＩＣＴＩＯＮＡＲＹ　ＯＦ　ＭＩＣＲＯＢＩＯＬＯＧＹ　ＡＮＤ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ，２Ｄ　ＥＤ．，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９９４），ａｎｄ　Ｈａｌｅ　＆　Ｍａｒｈａｍ，ＴＨＥ　ＨＡＲＰＥＲ　ＣＯＬＬＩＮＳ　ＤＩＣＴＩＯＮＡＲＹ　ＯＦ　ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｈａｒｐｅｒ　Ｐｅｒｅｎｎｉａｌ，ＮＹ（１９９１）は、本発明によって使用された多数の用語の一般的辞典を当業者に提供する。本発明の実践または試験において、本明細書に記載した方法および材料に類似するかまたはこれらと同等である任意の方法および材料を使用できるが、以下では好ましい方法および材料について記載する。数値範囲は、範囲を規定する数を含んでいる。他に指定しない限り、各々、核酸は左から右への５’から３’の方向に書かれている；アミノ酸配列は、左から右へのアミノからカルボキシ方向に書かれている。
【００１８】
本発明の実践は、他に特に指定しない限り、当業者の能力の範囲内に含まれる化学、分子生物学、微生物学、組換えＤＮＡおよび免疫学の従来型の技術を使用するであろう。そのような技術は文献において説明されている。例えば、Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｅ．Ｆ．

Ｆｒｉｔｓｃｈ，およびＴ．Ｍａｎｉａｔｉｓ，１９８９，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第2版，Ｂｏｏｋｓ １−３，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ；Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ら（１９９５および定期補遺；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，第９章，第１３章，および第１６章，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．）；Ｂ．Ｒｏｅ，Ｊ．Ｃｒａｂｔｒｅｅ，およびＡ．Ｋａｈｎ，１９９６，ＤＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ：Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ；Ｊ．Ｍ．ＰｏｌａｋおよびＪａｍｅｓ Ｏ’Ｄ．ＭｃＧｅｅ，１９９０，Ｉｎ Ｓｉｔｕ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ；Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ；Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ（編集），１９８４，Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｉｒｌ Ｐｒｅｓｓ；Ｄ．Ｍ．Ｊ．ＬｉｌｌｅｙおよびＪ．Ｅ．Ｄａｈｌｂｅｒｇ，１９９２，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ：ＤＮＡ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ Ｐａｒｔ Ａ：Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｈｙｓｉｃａｌ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ＤＮＡ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ：Ｐｏｒｔａｂｌｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌ ＮＯ．Ｉ ｂｙ Ｅｄｗａｒｄ Ｈａｒｌｏｗ，Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ（１９９９，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，ＩＳＢＮ ０−８７９６９−５４４−７）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ｂｙ Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ（編集），Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ（編集）（１９８８，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，ＩＳＢＮ ０−８７９６９−３１４−２），１８５５，Ｌａｒｓ−Ｉｎｇｅ Ｌａｒｓｓｏｎ“Ｉｍｍｕｎｏｃｙｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：Ｔｈｅｏｒｙ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ”，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ ｉｎｃ．，Ｂａｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌｏｒｉｄａ，１９８８，ＩＳＢＮ ０−８４９３−６０７８−１，Ｊｏｈｎ Ｄ．Ｐｏｕｎｄ（編集）；“Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，ｖｏｌ ８０”，ｉｎ ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ：“Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ”，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ，１９９８，ＩＳＢＮ ０−８９６０３−４９３−３，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ，Ｒａｍａｋｒｉｓｈｎａ Ｓｅｅｔｈａｌａ，Ｐｒａｂｈａｖａｔｈｉ Ｂ．Ｆｅｒｎａｎｄｅｓ（編集）（２００１，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，ＩＳＢＮ ０−８２４７−０５６２−９）；ならびにＬａｂ Ｒｅｆ：Ａ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｒｅｃｉｐｅｓ，Ｒｅａｇｅｎｔｓ，ａｎｄ Ｏｔｈｅｒ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｔｏｏｌｓ ｆｏｒ Ｕｓｅ ａｔ ｔｈｅ Ｂｅｎｃｈ，Ｅｄｉｔｅｄ Ｊａｎｅ Ｒｏｓｋａｍｓ ａｎｄ Ｌｉｎｄａ Ｒｏｄｇｅｒｓ，２００２，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，ＩＳＢＮ ０−８７９６９−６３０−３を参照されたい。これらの全記載は各々、参考として本明細書中に援用される。

【００１９】
すべての特許および刊行物は、本明細書で参照したそのような特許および刊行物の中で開示された全配列を含めて、明示的に参考として本明細書中に援用される。

【００２０】
（ＰＳ４改変体ポリペプチド）
本発明者らは、親酵素と比較して変化した特性、好ましくは変化したエキソ特異性もしくは変化した熱安定性、またはその両方を達成する１つ以上の位置で置換を有する非マルトース生成エキソアミラーゼを提供する。

【００２１】
本発明者らは、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有するポリペプチドを含む食

品添加物、食品、ベーカリー製品、改善剤組成物、動物用飼料を含む飼料製品などを含む組成物、ならびにそのようなポリペプチドおよび組成物の製造方法および使用方法をさらに提供する。本発明者らは、そのような組成物の他の使用（例えば、洗剤の調製における甘味料、シロップなどとしての使用）を提供する。本組成物は、少なくとも１つの他の構成成分とともに本ポリペプチドを含んでいる。具体的には、本発明者らは、本ポリペプチドを含む食品添加物または飼料添加物を提供する。

【００２２】

そのようなポリペプチドおよび核酸は、多数の突然変異を含むことによってそれらの親配列とは相違しており、便利にも、「ＰＳ４改変体ポリペプチド」として知られている。これを言い換えると、ＰＳ４改変体ポリペプチドもしくは核酸の配列は、多数の位置または残基でその親とは相違している。好ましい実施形態では、突然変異はアミノ酸置換、すなわち１つのアミノ酸残基と他のアミノ酸残基との交換を含んでいる。従って、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、親配列の１つ以上の位置でのアミノ酸残基の性質における多数の変化を含んでいる。

【００２３】

本明細書で使用する用語「改変体」は、親分子から誘導可能である分子を意味すると理解されたい。改変体には、ポリペプチドならびに核酸が含まれる。改変体は、特に、１つ以上の位置での置換、挿入、転換および転化を含んでいる。改変体は、短縮もまた含んでいる。改変体は、親分子の相同的かつ機能的な誘導体を含んでいる。改変体は、本明細書に明示したヌクレオチド配列へハイブリダイズすることができる、配列に相補的である配列を含んでいる。

【００２４】

（ＰＳ４改変体ポリペプチドに対する置換）

本発明者らは、非マルトース生成エキソアミラーゼ配列内にアミノ酸置換を含む配列変化を伴うＰＳ４改変体ポリペプチドを提供する。アミノ酸置換は、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して、２６位、７０位、１２１位、１４５位、１４６位、１５７位、１５８位、１６１位、１８８位、１９８位、２２３位、２２９位、２７２位、３０３位、３０６位、３０９位、３１６位、３３９位および３５３位のうちの任意の１つ以上の位置に存在し得る。

【００２５】

アミノ酸突然変異は、（ａ）１２１位、１６１位、２２３位；（ｂ）１４６位、１５７位、１５８位、１９８位、２２９位、３０３位、３０６位、３０９位、３１６位、３５３位；および（ｃ）２６位、７０位、１４５位、１８８位、２７２位、３３９位；ならびに（ａ）、（ｂ）および（ｃ）の任意の組み合わせからなる群から選択される１つ以上の位置に存在し得る。

【００２６】

アミノ酸置換は、１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋへの変化を含んでいてよい。または、あるいは追加して、アミノ酸置換は、１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑ、３５３Ｔへの変化を含んでいてよい。さらにまたは、あるいは追加して、アミノ酸置換は、２６Ｅ、７０Ｄ、１１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ、１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａ、３３９Ｅへの変化を含んでいてよい。

【００２７】

そのような改変体ポリペプチドは、本明細書では「ＰＳ４改変体ポリペプチド」と呼ばれる。そのような改変体ポリペプチドをコードする核酸もまた開示されており、便宜的に「ＰＳ４改変体核酸」と呼ばれるであろう。以下ではＰＳ４改変体ポリペプチドおよびＰＳ４改変体核酸についてより詳細に記載する。

【００２８】

「親」配列、すなわちＰＳ４改変体ポリペプチドおよびＰＳ４改変体核酸が基づくところの配列は、好ましくは非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有するポリペプチドである。したがって用語「親酵素」および「親ポリペプチド」は、ＰＳ４改変体ポリペプチドが基づくところの酵素およびポリペプチドを意味すると解釈されたく、かつ見なされたい。以下ではそれらをさらに詳細に記載する。

【００２９】

特に好ましい実施形態では、親配列は非マルトース生成エキソアミラーゼ酵素、好ましくは細菌性非マルトース生成エキソアミラーゼ酵素である。非常に好ましい実施形態では、親配列は、グルカン１，４－α－マルトテトラヒドロラーゼ（ＥＣ３．２．１．６０）を含んでいる。好ましくは、親配列はシュードモナス種、例えばＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａまたはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉから誘導可能である。

【００３０】

一部の実施形態では、親ポリペプチドは、例えばシュードモナス種由来の野生型非マルトース生成エキソアミラーゼ配列を含むか、またはそれと相同である。

【００３１】

従って、親ポリペプチドは、配列番号１に示した配列を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース生成エキソアミラーゼを含む可能性がある。他の実施形態では、親ポリペプチドは、配列番号１１に示した配列を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ由来の非マルトース生成エキソアミラーゼを含んでいるか、またはＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ１３５０７を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ非マルトース生成エキソアミラーゼを含んでいる。

【００３２】

他方、親ポリペプチドは、任意の野生型配列の改変体であってもよい。つまり、親ポリペプチドはそれ自体が操作されていてもよく、またはＰＳ４改変体ポリペプチドを含んでいてもよい。

【００３３】

しかし、ＰＳ４改変体ポリペプチドはすでに突然変異している配列を突然変異させることによって誘導可能であるが、そのような改変体ポリペプチドは、野生型配列（または実際は任意の適切な配列）から出発する工程と、出発配列と所望の改変体との間の相違を同定する工程と、および所望の改変体を得るために必要な突然変異を出発配列に導入する工程とによって構築できることは、当業者には明白であろう。

【００３４】

配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース生成エキソアミラーゼ配列または配列番号１１に示した配列を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ非マルトース生成エキソアミラーゼに関連するタンパク質および核酸、好ましくはこれらと配列相同性または機能的相同性を有するタンパク質および核酸は、本明細書では「ＰＳ４ファミリー」のメンバーであると呼ばれる。以下ではＰＳ４改変体ポリペプチドおよびＰＳ４改変体核酸を生成する際に使用するために適切な「ＰＳ４ファミリー」非マルトース生成エキソアミラーゼ酵素の例についてさらに詳細に開示する。

【００３５】

本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドは、好ましくは親ポリペプチドの特徴を維持しており、そしてさらに好ましくはさらなる有益な特性、例えば増強した活性もしくは熱安定性、またはｐＨ耐性、あるいは任意の組み合わせ（好ましくは全部）を有する。以下ではこれをさらに詳細に記載する。

【００３６】

本明細書に記載したＰＳ４置換変異体は、任意の適切な目的のために使用できる。この変異体は、好ましくは親酵素が適切である目的のために使用できる。具体的には、この変異体は、エキソ－マルトテトラヒドロラーゼが使用される任意の用途において使用できる

。非常に好ましい実施形態では、この変異体は、より高度の熱安定性、またはより高度のエキソアミラーゼ活性もしくはより高度のｐＨ安定性、あるいは任意の組み合わせの追加された長所を有する。ＰＳ４改変体ポリペプチドおよびＰＳ４改変体核酸についての適切な使用の例には、食品製造（特にベーキング）、ならびに食材の製造が含まれる；以下ではその他の例について詳細に記載する。

【００３７】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、上記に記載した位置に加えて１つ以上のさらなる突然変異を含んでいてよい。それらは、すでに記載したものに加えて、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ以上の突然変異、好ましくは置換であってもよい。１つ以上の他の場所での欠失、挿入、置換、転換、転位および転化のような他の突然変異もまた含むことができる。さらに、ＰＳ４改変体は、列挙した位置のすべての置換を有している必要はない。実際に、それらは１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換欠損（すなわち野生型アミノ酸残基がそのような位置に存在する）を有していてよい。

【００３８】

（野生型配列に基づくＰＳ４改変体ポリペプチド）

親ポリペプチドが野生型配列を含む実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチドは野生型配列であって、１２１位、１６１位および２２３位のうちの任意の１つ以上の位置における突然変異、好ましくは１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅもしくは２２３Ｋ、より好ましくはＧ１２１Ｆ、Ｇ１２１Ｙ、Ｇ１２１Ｗ、Ｓ１６１Ａ、Ｇ２２３ＥもしくはＧ２２３Ｋの突然変異を有する配列を、含み得る。

【００３９】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、野生型配列、もしくは先行段落に記載の配列であって、１４６位、１５７位、１５８位、１９８位、２２９位、３０３位、３０６位、３０９位、３１６位もしくは３５３位のうちの任意の１つ以上の位置での突然変異、好ましくは１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑもしくは３５３Ｔ、より好ましくは１４６Ｇ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１９８Ｗ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐもしくは３５３Ｔの突然変異を有する配列を、含み得る。

【００４０】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、野生型配列、もしくは先行する２つの段落に記載した配列であって、２６位、７０位、１４５位、１８８位、２７２位もしくは３３９位のうちの任意の１つ以上の位置での突然変異、好ましくは２６Ｅ、２６Ｄ、７０Ｄ、１４５Ｄ、１８８Ｓ、１８８Ｔ、１８８Ｈ、２７２Ｑ、３３９Ａもしくは３３９Ｅ、より好ましくはＮ２６Ｅ、Ｎ２６Ｄ、Ｇ７０Ｄ、Ｎ１４５Ｄ、Ｇ１８８Ｓ、Ｇ１８８Ｔ、Ｇ１８８Ｈ、Ｈ２７２Ｑ、Ｗ３３９ＡもしくはＷ３３９Ｅの突然変異を有する配列を、含み得る。

【００４１】

一般に、位置、置換および特定の突然変異の任意の組み合わせは、本明細書に開示したＰＳ４改変体ポリペプチドを生成するために任意の方法および任意の数で組み合わせることができる。

【００４２】

従って、本発明者らは、野生型ＰＳ４親配列、好ましくは配列番号１に示した配列を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース生成エキソアミラーゼに基づくＰＳ４改変体ポリペプチドを開示する。従って、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、配列番号１に示した配列であって、上記に記載した位置における任意の１つ以上の突然変異を有する配列を、含み得る。ＰＳ４改変体ポリペプチドは、以下の配列番号７に示す野生型Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ非マルトース生成酵素配列に基づき得るが、上記に記載した位置における任意の１つ以上の突然変異を伴っていてよい。

【００４３】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは野生型ＰＳ４親配列に基づいてよいが、好ましい実施形態

では、ＰＳ４改変体ポリペプチドは野生型ＰＳ４親配列の操作された（もしくは突然変異した）バージョンに基づいている。従って、そのような実施形態では、親配列はすでに突然変異したＰＳ４配列を含んでいる。そのような配列は、新規に作製され得るか、または以下でより詳細に記載するように、１つの塩基配列を１回以上突然変異させることによって作製され得る。

【００４４】

（１２１位、１６１位および／または２２３位）

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、野生型配列、または１２１位、１６１位および２２３位などの１つ以上の位置での置換を伴うすでに突然変異した配列のような野生型配列の改変体である変異体配列を含んでいてもよい。

【００４５】

従って、一般に、関連位置におけるこの突然変異は、有益には１２１位、１６１位もしくは２２３位の１つ、２つもしくは全部におけるさらなる単一の突然変異と組み合わせることができる。

【００４６】

１２１位の置換は、存在する場合は、好ましくは１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１２１Ｈ、１２１Ａ、１２１Ｍ、１２１Ｇ、１２１Ｓ、１２１Ｔ、１２１Ｄ、１２１Ｅ、１２１Ｌ、１２１Ｋおよび１２１Ｖからなる群から選択される。好ましくは、１２１位の置換は、１２１Ｆ、１２１Ｙまたは１２１Ｗである。１６１位の置換は、存在する場合は、好ましくは１６１Ａ，より好ましくはＳ１６１Ａである。１６１位が突然変異している場合は、１６０位におけるさらなる突然変異（好ましくは１６０Ｄ、より好ましくはＥ１６０Ｄ）もまた存在し得る。

【００４７】

２２３位の置換は、存在する場合は、好ましくは２２３Ｋ、２２３Ｅ、２２３Ｖ、２２３Ｒ、２２３Ａ、２２３Ｐおよび２２３Ｄからなる群から選択される。より好ましくは、２２３位の置換は２２３Ｅまたは２２３Ｋである。特に好ましい実施形態では、さらなる置換が、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１２１Ｙ、Ｇ１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅおよび２２３Ｋからなる群から選択される。

【００４８】

特に好ましい実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、少なくとも３つの以下の置換：１２１Ｆ／Ｙ／Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ／Ｋを含んでいる。以下に記載するその他の突然変異を含むことができる。

【００４９】

（１４６位、１５７位、１５８位、１９８位、２２９位、３０３位、３０６位、３０９位、３１６位および３５３位）

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、１４６位、１５７位、１５８位、１９８位、２２９位、３０３位、３０６位、３０９位、３１６位および３５３位のような１つ以上の位置における置換を有する、野生型配列または野生型配列の改変体である変異体配列（例えば、１２１位、１６１位および２２３位のうちの１つ以上の位置における突然変異を有するＰＳ４改変体ポリペプチドを含む、既に変異した配列）を含み得る。

【００５０】

（２６位、７０位、１４５位、１８８位、２７２位および３３９位）

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、２６位、７０位、１４５位、１８８位、２７２位および３３９位のような１つ以上の位置における置換を有する、野生型配列または野生型配列の改変体である変異体配列（例えば、１２１位、１６１位、２２３位、１４６位、１５７位、１５８位、１９８位、２２９位、３０３位、３０６位、３０９位、３１６位および３５３位のうちの１つ以上の位置における突然変異を有するＰＳ４改変体ポリペプチドを含む、既に変異した配列）を含み得る。

【００５１】

従って、一般に、関連位置におけるこの突然変異は、有益には、２６位、７０位、１４

５位、１８８位、２７２位および３３９位の１つ、２つもしくは全部におけるさらなる単一の突然変異と組み合わせることができる。

【００５２】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、２６位における置換、好ましくは２６Ｅまたは２６Ｅを含んでいてよい。より好ましくは、２６位の置換はＮ２６ＥまたはＮ２６Ｄを含んでいる。最も好ましくは、２６位の置換はＮ２６Ｅを含んでいる。

【００５３】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、７０位における置換、好ましくは７０Ｄを含んでいてよい。より好ましくは、２６位の置換はＧ７０Ｄを含んでいる。

【００５４】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、１４５位における置換、好ましくは１４５Ｄを含んでいてよい。より好ましくは、１４５位の置換はＮ１４５Ｄを含んでいる。

【００５５】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、１８８位における置換、好ましくは１８８Ｓ、１８８Ｔまたは１８８Ｈを含んでいてよい。より好ましくは、１８８位の置換はＧ１８８Ｓ、Ｇ１８８ＴまたはＧ１８８Ｈを含んでいる。最も好ましくは、１８８位の置換はＧ１８８ＳまたはＧ１８８Ｈを含んでいる。

【００５６】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、２７２位における置換、好ましくは２７２Ｑを含んでいてよい。より好ましくは、２７２位の置換はＨ２７２Ｑを含んでいる。

【００５７】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、Ｗ３３９Ａの位置における置換、好ましくは３３９Ａまたは３３９Ｅを含んでいてよい。より好ましくは、３３９位における置換はＷ３３９ＡまたはＷ３３９Ｅを含んでいる。

【００５８】

（改変体配列に基づくＰＳ４改変体ポリペプチド）

（３３位、３４位、１２１位、１３４位、１４１位、１５７位、１７８位、１７９位、２２３位、３０７位および／または３３４位との組み合わせ）

一部の実施形態では、親配列は、３３位、３４位、１２１位、１３４位、１４１位、１５７位、１７８位、１７９位、２２３位、３０７位および３３４位のうちの１つ以上の位置、好ましくは全部の位置での突然変異を含んでいる（したがって、ＰＳ４改変体ポリペプチドは関連の対応する突然変異を含む）。

【００５９】

そのような実施形態では、突然変異は、好ましくはＮ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｄ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７ＬおよびＳ３３４Ｐのうちの１つ以上、好ましくは全部である。

【００６０】

そのような実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、便利にも、配列ＰＳａｃ－Ｄ３４（配列番号２）を含むＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース酵素配列から誘導可能である。

【００６１】

（３３位、３４位、１２１位、１３４位、１４１位、１５７位、１７８位、１７９位、２２３位、３０７位ならびに３３４位、１２１位、１６１位および／または２２３位との組み合わせ）

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、１２１位、１６１位および／または２２３位のいずれかにおける突然変異と組み合わせて３３、３４、１２１、１３４、１４１、１５７、１７８、１７９、２２３、３０７および３３４位のいずれかにおける突然変異をさらに含み得る。従って、本発明者らは、以下の任意の組み合わせを含むＰＳ４改変体ポリペプチドを開示する：（ａ）残基３３位、３４位、１２１位、１３４位、１４１位、１５７位、１７８位、１７９位、２２３位、３０７位および３３４位における任意の１つ以上の突然変異、

好ましくはＮ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｄ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７ＬおよびＳ３３４Ｐ；（ｂ）１２１位、１６１位もしくは２２３位における任意の１つ以上の突然変異、好ましくは１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅもしくは２２３Ｋ、より好ましくは１２１Ｆ、１６１Ａもしくは２２３Ｅ位、および（ｃ）１４６位、１５７位、１５８位、１９８位、２２９位、３０３位、３０６位、３０９位、３１６位もしくは３５３位における任意の１つ以上の突然変異、好ましくは１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑもしくは３５３Ｔ、より好ましくは１４６Ｇ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１９８Ｗ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐもしくは３５３Ｔの。

【００６２】

一部の好ましい実施形態では、本発明者らは、上記の（ｃ）に記載した１つ以上の突然変異と組み合わせた上記の（ａ）に記載した突然変異の全部を含む、ＰＳ４改変体ポリペプチドを提供する。他の好ましい実施形態では、本発明者らは、上記の（ｃ）に記載した任意の１つ以上の突然変異と組み合わせた、上記の（ｂ）に記載した突然変異の全部と組み合わせた、上記の（ａ）に記載した突然変異の全部を含む、ＰＳ４改変体ポリペプチドを提供する。

【００６３】

（ｐＭＤ９６に基づくＰＳ４改変体ポリペプチド）

（ａ）および（ｂ）の全部における突然変異が含まれる実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、便利にも、配列ｐＭＤ９６（配列番号１４）を含むＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース酵素配列から誘導可能である。

【００６４】

従って、本発明者らは、具体的には、配列番号１５～２８を有する、実施例１２～２０に記載のＰＳ４改変体ポリペプチドを提供する。実施例に示したように、これらのポリペプチドは各々、その親と比較して１つ以上の改善された特性を有する。

【００６５】

（その他の組み合わせ）

さらに、他の位置（例えば１３４位、１４１位、１５７位、２２３位、３０７位および３３４位のうちの任意の１つ以上の位置）における突然変異を含む親配列もまた使用され得る。必要に応じて、これらは３３位および３４位の一方または両方における突然変異を含み得る。

【００６６】

従って、親配列は、１３４位、１４１位、１５７位、２２３位、３０７位、３３４位、ならびに必要に応じて３３位および３４位からなる群から選択される位置における１つ以上の突然変異を含んでいてよい（したがって、当然ながらＰＳ４改変体ポリペプチドは関連の対応する突然変異もまた含む）。

【００６７】

一部の実施形態では、親ポリペプチドは、１３４位におけるアルギニン、１４１位におけるプロリン、３３４位におけるプロリンの置換（例えばＧ１３４Ｒ、Ａ１４１ＰおよびＳ３３４Ｐ）を含んでいる。

【００６８】

さらなる実施形態では、親ポリペプチドは、１２１位における突然変異をさらに含んでいる。親ポリペプチドは、１７８位における突然変異をさらに含んでいてよい。親ポリペプチドは、１７９位における突然変異をさらに含んでいてよい。親ポリペプチドは、８７位における突然変異をなおさらに含んでいてよい。各々の特に好ましい置換は、好ましくは１２１Ｄ、より好ましくはＧ１２１Ｄ、好ましくは１７８Ｆ、より好ましくはＬ１７８Ｆ、好ましくは１７９Ｔ、より好ましくはＡ１７９Ｔおよび好ましくは８７Ｓ、より好ましくはＧ８７Ｓである。

【００６９】
これらの位置における残基は、多数の残基によって置換されてよい（例えばＩ１５７ＶもしくはＩ１５７ＮもしくはＧ２２３ＬもしくはＧ２２３ＩもしくはＧ２２３ＳもしくはＧ２２３ＴもしくはＨ３０７ＩもしくはＨ３０７ＶもしくはＤ３４ＧもしくはＤ３４ＡもしくはＤ３４ＳもしくはＤ３４ＴもしくはＡ１７９Ｖ）。しかし、親ポリペプチドは、好ましくは置換Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｌ１７８ＦおよびＡ１７９Ｔ（必要に応じてＮ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ）を含んでいる。
【００７０】
非常に好ましい実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、１４６位、１５７位、１５８位、１９８位、２２９位、３０３位、３０６位、３０９位、３１６位および３５３位のうちの任意の１つ以上の位置での置換、好ましくは１４６Ｇ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１９８Ｗ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐもしくは３５３Ｔを含み、ならびにＬ１７８ＦおよびＡ１７９Ｔの一方または両方と一緒に、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ、Ｎ３３ＹおよびＤ３４Ｎのうちの１つ以上の置換を含んでいる。
【００７１】
（ＰＳａｃ－Ｄ２０に基づくＰＳ４改変体ポリペプチド）
ＰＳ４改変体は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース生成親酵素配列ＰＳａｃ－Ｄ２０（配列番号３）に基づいていてよい。
【００７２】
そのような実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、１４６位、１５７位、１５８位、１９８位、２２９位、３０３位、３０６位、３０９位、３１６位および３５３位のうちの任意の１つ以上の位置における置換、好ましくは１４６Ｇ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１９８Ｗ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐもしくは３５３Ｔを含み、ならびにＬ１７８ＦおよびＡ１７９Ｔの一方または両方と一緒に、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ、Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４ＮおよびＧ１２１Ｄのうちの１つ以上の置換を含んでいる。
【００７３】
（ＰＳａｃ－Ｄ１４に基づくＰＳ４改変体ポリペプチド）
ＰＳ４改変体は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース生成親酵素配列ＰＳａｃ－Ｄ１４（配列番号４）に基づいていてよい。
【００７４】
このためそのような実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、１４６位、１５７位、１５８位、１９８位、２２９位、３０３位、３０６位、３０９位、３１６位および３５３位のうちの任意の１つ以上の位置での置換、好ましくは１４６Ｇ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１９８Ｗ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐもしくは３５３Ｔを含み、ならびにＬ１７８ＦおよびＡ１７９Ｔの一方または両方と一緒に、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ、Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１ＤおよびＧ８７Ｓのうちの１つ以上の置換を含んでいる。
【００７５】
（ｐＭＤ５５に基づくＰＳ４改変体ポリペプチド）
ＰＳ４改変体は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース生成親酵素配列ｐＭＤ５５（配列番号１３）に基づいていてよい。
【００７６】
そのような実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチドは位、１４６位、１５７位、１５８位、１９８位、２２９位、３０３位、３０６位、３０９位、３１６位および３５３位のうちの任意の１つ以上の位置での置換、好ましくは１４６Ｇ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１９８Ｗ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐもしくは３５３Ｔを含み、ならびにＬ１７８ＦおよびＡ１７９Ｔの一方または両方と

一緒に、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ、Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１ＦおよびＧ８７Ｓのうちの１つ以上の置換を含んでいる。ＰＳ４改変体ポリペプチドは、そのような置換を有する親ポリペプチドから誘導され得る。

【００７７】

（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ親ポリペプチドに基づくＰＳ４改変体ポリペプチド）

一部の実施形態では、ＰＳ４改変体は、好ましくは以下の配列番号７に示したように、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ非マルトース生成酵素配列から誘導される。

【００７８】

したがって、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、配列ＰＳｔｕ－Ｄ３４（配列番号８）から誘導することができる。本発明者らは、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ非マルトース生成酵素配列に基づき、かつＧ１２１および／またはＧ８７の置換を含むＰＳ４改変体ポリペプチドを開示する。これらは、Ｌ１７８ＦおよびＡ１７９Ｔの一方または両方と一緒に、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ、Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４ＮおよびＧ１２１Ｄを含んでいてよく、ならびにＰＳ４改変体ポリペプチドはＬ１７８ＦおよびＡ１７９Ｔの一方または両方と一緒に、次の置換：Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ、Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１ＤおよびＧ８７Ｓの置換を含んでいてよい。

【００７９】

従って、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ非マルトース生成酵素親配列から誘導することができ、その親配列は、Ｇ１２１Ｄを含む配列ＰＳｔｕ－Ｄ２０（配列番号９）、またはＧ８７Ｓをさらに含む配列ＰＳｔｕ－Ｄ１４（配列番号１０）を有し得る。

【００８０】

（ＰＳ４改変体核酸）

本発明者らはまた、ＰＳ４改変体ポリペプチド配列における変化に対応する配列、またはこの変化をコードする配列を有するＰＳ４核酸であって、本明細書に記載した目的のためにそのようなポリペプチドを作製する際に使用するためのＰＳ４核酸を、さらに記載する。従って、本発明者らは、本明細書に記載した任意のポリペプチド配列をコードできる核酸を提供する。

【００８１】

当業者は、核酸配列とポリペプチド配列との間、特に遺伝コードとこのコードの縮重との間の関係を知っており、そして困難なくそのようなＰＳ４核酸を構築できるであろう。例えば、当業者は、ＰＳ４改変体ポリペプチド配列内の各アミノ酸置換について、置換アミノ酸をコードする１つ以上のコドンがあり得ることを知っているであろう。したがって、特定アミノ酸残基に関する遺伝コードの縮重に依存して、ＰＳ４改変体ポリペプチド配列に対応する１種以上のＰＳ４核酸配列を生成できることは明白であろう。さらに、ＰＳ４改変体ポリペプチドが１つより多い置換（例えばＡ１４１Ｐ／Ｇ２２３）を含む場合は、対応するＰＳ４核酸は、２つのアミノ酸変化を各々コードするコドンの対の組み合わせを含んでいてよい。

【００８２】

ＰＳ４改変体核酸配列は、上述した親ポリペプチドのいずれかをコードする親核酸から誘導することができる。特に、親核酸は、野生型配列、例えば配列番号６または配列番号１２を含んでいてよい。従ってＰＳ４改変体核酸は、野生型非マルトース生成エキソアミラーゼをコードし得るが、野生型アミノ酸残基の代わりに関連位置で別のアミノ酸をコードする核酸を含んでいてもよい。ＰＳ４改変体核酸配列は、１つ以上の突然変異を伴う、例えば「組み合わせ」の下で上述した親ポリペプチドをコードする野生型配列をさらに含んでいてよい。

【００８３】

特定のＰＳ４改変体核酸配列とは同一ではないが、これらに関連する核酸配列（例えば、ＰＳ４改変体核酸配列の改変体、ホモログ、誘導体もしくはフラグメント、またはこれらにハイブリダイズすることができる相補体もしくは配列）は、本明細書に記載した方法および組成物のためにも有用であろうことは理解されるであろう。文脈が他のことを指示しない限り、用語「ＰＳ４改変体核酸」は、上記に列挙したこれらの実体の各々を含むと理解されたい。

【００８４】

アミノ酸配列および核酸配列における突然変異は、当技術分野において公知であるように、任意の多数の技術によって作製できる。改変体配列は、任意の公知の突然変異誘発技術（例えば，適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いたＰＣＲを使用する部位特異的突然変異誘発、５’付加（ａｄｄ－ｏｎ）突然変異誘発、ミスマッチプライマー突然変異誘発など）を用いて容易に作製できる。または、あるいは追加して、ＰＳ４改変体核酸配列は新規に作製できる。

【００８５】

特に好ましい実施形態では、突然変異は、実施例に例示したように、適切なプライマーを用いたＰＣＲ（ポリメラーゼ連鎖反応）によって親配列内に導入される。このため、記載のように、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａまたはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉエキソアミラーゼのような、好ましくは非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチドに、アミノ酸または核酸レベルで任意の所望のアミノ酸置換を導入することによって、ポリペプチドの配列を変化させることが可能である。本発明者らは、非マルトース生成エキソアミラーゼの配列が非マルトース生成エキソアミラーゼをコードする核酸の配列を変化させる工程によって変化させられる方法を記載する。

【００８６】

しかし、当然ながら、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、実際のところ、例えば漸進的な突然変異によって野生型ポリペプチドもしくは野生型核酸配列から実際に誘導される必要はないことは理解されるであろう。むしろ、ＰＳ４改変体ポリペプチドの配列が確立されれば、当業者は、例えば適切なオリゴヌクレオチドプライマーおよびＰＣＲを用いて、当技術分野において公知の手段によって野生型から全突然変異を備える配列を容易に作製することができる。実際に、突然変異全部を有するＰＳ４改変体ポリペプチドは、例えば、ペプチド合成方法を通して、新規に作製することができる。

【００８７】

しかし一般に、ＰＳ４改変体ポリペプチドおよび／またはＰＳ４改変体核酸は、「前駆物質」配列から誘導されるか、または誘導可能である。本明細書で使用する用語「前駆物質」は、本明細書に記載した方法および組成物に従って改変される酵素に先行する酵素を意味する。従って、前駆物質は、改変された酵素を生成するために使用される酵素を含んでいる。従って、前駆物質は、本明細書のどこかで記載した突然変異誘発によって改変される酵素であり得る。同様に、前駆物質は、野生型酵素、改変体野生型酵素またはすでに突然変異した酵素であってもよい。

【００８８】

ＰＳ４改変体ポリペプチドおよびＰＳ４改変体核酸は、当技術分野において公知である任意の手段によって生成できる。具体的には、ＰＳ４改変体ポリペプチドおよびＰＳ４改変体核酸は、本質的にインビトロまたはインビボであり得る発現系から発現させることができる。具体的には、本発明者らは、好ましくはＰＳ４改変体ポリペプチドを発現できる、ＰＳ４核酸配列を含むプラスミドおよび発現ベクターについて記載する。ＰＳ４核酸、プラスミドおよびベクターを含み、好ましくはそのようなＰＳ４核酸、プラスミドおよびベクターを用いて形質転換されている、細胞および宿主細胞もまた開示され、これらもまた本明細書に含まれることも明確にしておきたい。

【００８９】

好ましい実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチド配列は、単離形態で食品添加物とし

て使用される。用語「単離された」は、その配列が天然において見いだされるように天然において本質的に関連している少なくとも１つの他の構成成分を、その配列が少なくとも実質的に含んでいないことを意味する。１つの態様では、好ましくは、その配列は精製形態にある。用語「精製された」は、その配列が比較的純粋な状態（例えば、少なくとも約９０％純粋、または少なくとも約９５％純粋または少なくとも約９８％純粋）であることを意味する。

【００９０】

（位置の番号付け）

本明細書において番号によって言及するすべての位置は、以下に示すＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ参照配列（配列番号１）の番号に関連する：

【００９１】

【化１】

```
  1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APNDWYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
 61 RDFSSWTDGG KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 GYPDKEINLP AGQGFWRNDC ADPGNYPNDC DDGDRFIGGE SDLNTGHPQI YGMFRDELAN
181 LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKGPSEYPSW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHHWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWSHMYDWG YGDFIRQLIQ VRRTAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGS
421 GDGGGNDGGE GGLVNVNFRC DNGVTQMGDS VYAVGNVSQL GNWSPASAVR LTDTSSYPTW
481 KGSIALPDGQ NVEWKCLIRN EADATLVRQW QSGGNNQVQA AAGASTSGSF
```

この参照配列は、ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ２２９６３を有するがシグナル配列

【００９２】

【化２】

MSHILRAAVLAAVLLPFPALA

を備えていないＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ配列に由来する。

【００９３】

Ｃ末端デンプン結合ドメイン

【００９４】

【化３】

```
                                 EGGLVNVNFR CDNGVTQMGD SVYAVGNVSQ
LGNWSPASAV RLTDTSSYPT WKGSIALPDG QNVEWKCLIR NEADATLVRQ WQSGGNNQVQ
AAAGASTSGS F
```

は任意で無視することができる。または、それが含まれていてもよい。

【００９５】

本明細書の文脈においては、ＰＳ４エキソアミラーゼ酵素におけるアミノ酸残基の位置の特定の番号付けが使用される。これに関連して、様々な公知のエキソアミラーゼのアミノ酸配列のアラインメントによって、アミノ酸配列が公知である任意のエキソアミラーゼ酵素における任意のアミノ酸残基位置に対しエキソアミラーゼアミノ酸位置番号を明白に割り当てることが可能である。、他の公知の多数のエキソアミラーゼのアミノ酸配列と並列させた、例えばＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａから得られたエキソアミラーゼのアミノ酸配列に由来するこの番号付けシステムを用いて、エキソアミラーゼ内のアミノ酸残基の位置を明白に指示することが可能である。

【００９６】

従って、番号付けシステムは、それが基本参照点として特定の配列を使用できる場合でさえ、すべての関連相同配列にも適用することができる。例えば、位置の番号付けは、他のシュードモナス種由来の相同配列または他の細菌由来の相同配列に適用できる。好ましくは、そのような相同配列は、上記の配列番号１の配列、ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴアクセッ

ション番号Ｐ２２９６３もしくはＰ１３５０７を有する配列または好ましくはこれら全部の配列と、６０％以上の相同性、例えば７０％以上、８０％以上、９０％以上または９５％以上の相同性を有する。タンパク質間の配列相同性は、本明細書に記載の周知のアラインメントプログラムおよびハイブリダイゼーション技術を用いて確定することができる。そのような相同配列、ならびに以下に記載する機能的同等物を、本明細書では「ＰＳ４ファミリー」と呼ぶ。

【００９７】

さらに、そして上記に記載したように、本明細書で使用した番号付けシステムは、参照配列の配列番号１を参照しており、この配列は、ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ２２９６３を有するが、シグナル配列

【００９８】

【化４】

MSHILRAAVLAAVLLPFPALA

を備えていないＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ配列から誘導される。このシグナル配列は、参照配列のＮ末端に位置しており、２１アミノ酸残基からなる。したがって、シグナル配列を含む対応する配列内、または実際に任意の他のＮ末端もしくはＣ末端の伸長もしくは欠失を含む対応する配列内において、突然変異されるかもしくは置換される特定の残基を同定することは、慣用的である。Ｎ末端への付加もしくは欠失に関連して、挿入または欠失される残基の数によって位置の番号付けを相殺することだけが、必要とされる全てである。例えば、配列番号１における１位はシグナル配列を備える配列内の２２位に対応する。

【００９９】

（親酵素／ポリペプチド）

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、「親酵素」、「親ポリペプチド」または「親配列」として知られる別の配列から誘導されるか、またはそれらの改変体である。

【０１００】

本明細書で使用する用語「親酵素」は、生じる改変体（すなわちＰＳ４改変体ポリペプチドもしくはＰＳ４改変体核酸）に対して緊密な、好ましくは最も緊密な化学構造を有する酵素を意味する。親酵素は、前駆物質酵素（すなわち、実際に突然変異している酵素）であってもよく、または新規に作製されてもよい。親酵素は野生型酵素であってもよく、または１つ以上の突然変異を含む野生型酵素であってもよい。

【０１０１】

本明細書で使用する用語「前駆物質」は、酵素を生成するように改変されている、該酵素に先行する酵素を意味する。従って、前駆物質は突然変異誘発によって改変される酵素であってもよい。同様に、前駆物質は、野生型酵素、改変体野生型酵素またはすでに突然変異した酵素であってもよい。

【０１０２】

用語「野生型」は、当業者によって理解されている技術用語であり、天然に存在する種の大多数のメンバーに特徴的であり、突然変異体の表現型とは対照的な表現型を意味する。従って、本明細書の文脈では、野生型酵素は、関連種の大多数のメンバーにおいて天然に見いだされる酵素の形態である。一般に、本明細書に記載した改変体ポリペプチドに関連する関連野生型酵素は、配列相同性に関して最も緊密に関連する対応する野生型酵素である。しかし、特定の野生型配列が本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドを生成するためのベースとして使用されていた場合は、アミノ酸配列相同性に関してより密接に関連する別の野生型配列の存在に関わりなく、この特定の配列が対応する野生型配列となる。

【０１０３】

親酵素は、好ましくは、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を示すポリペプチドである。好ましくは、親酵素は、非マルトース生成エキソアミラーゼ自体である。例えば、親酵素は、ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ２２９６３を有するポリペプチド

のようなＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース生成エキソアミラーゼであってもよく、またはＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ１３５０７を有するポリペプチドのようなＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ非マルトース生成エキソアミラーゼであってもよい。

【０１０４】

ＰＳ４ファミリーの他のメンバーも親酵素として使用できる；そのような「ＰＳ４ファミリーメンバー」は、一般にこれら２種の酵素のいずれかに類似するか、相同であるか、または機能的に同等であり、そしてプローブを用いる適切なライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングのような標準方法またはゲノム配列分析によって同定することができる。

【０１０５】

特に、これら２種の酵素の一方の機能的同等物、ならびに「ＰＳ４ファミリー」の他のメンバーもまた、本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドを生成するための出発点または親ポリペプチドとして使用できる。

【０１０６】

タンパク質の「機能的同等物」は、そのタンパク質の機能の１つ以上、好ましくは実質的に全部を共有するものを意味する。好ましくは、そのような機能は生物学的機能であり、好ましくはアミラーゼ活性のような酵素機能であり、好ましくは非マルトース生成エキソアミラーゼ活性である。親酵素に関連して、用語「機能的同等物」は、好ましくは親分子と類似する機能、または同一の機能を有する分子を意味する。親分子は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース生成エキソアミラーゼもしくはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ非マルトース生成エキソアミラーゼ、または他の起源から得たポリペプチドであってもよい。

【０１０７】

ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ２２９６３を有するポリペプチドのようなＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース生成エキソアミラーゼ、またはＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ１３５０７を有するポリペプチドのようなＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ非マルトース生成エキソアミラーゼである親酵素に関連する用語「機能的同等物」は、他の起源から得られ得る機能的同等物を意味する。機能的に同等の酵素は、相違するアミノ酸配列を有していてよいが、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する。機能性を決定するためのアッセイの例は本明細書に記載されており、当業者には公知である。

【０１０８】

非常に好ましい実施形態では、機能的同等物は、上述したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース生成エキソアミラーゼおよびＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ非マルトース生成エキソアミラーゼの一方、好ましくは両方に対する配列相同性を有する。機能的同等物は、配列番号１～１４のいずれか、好ましくは配列番号１もしくは７または両方に記載した配列との配列相同性を有し得る。そのような配列間の配列相同性は、好ましくは少なくとも６０％、好ましくは６５％以上、好ましくは７５％以上、好ましくは８０％以上、好ましくは８５％以上、好ましくは９０％以上、好ましくは９５％以上である。そのような配列相同性は、当技術分野において公知である多数のコンピュータープログラムのいずれか、例えばＢＬＡＳＴまたはＦＡＳＴＡなどによって生成することができる。そのようなアラインメントを実行するために適切なコンピュータープログラムは、ＧＣＧ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ，Ｕ．Ｓ．Ａ；Ｄｅｖｅｒｅｕｘら，１９８４，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　１２：３８７）である。配列比較を実行できる他のソフトウエアの例には、ＢＬＡＳＴパッケージ（Ａｕｓｕｂｅｌら，１９９９同書、Ｃｈａｐｔｅｒ１８を参照）、ＦＡＳＴＡ（Ａｔｓｃｈｕｌら，１９９０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，４０３－４１０）および比較ツールのＧＥＮＥＷＯＲＫＳパッケージソフトが含まれるが、それらに限定されない。ＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡはどち

らもオフラインおよびオンライン検索のために利用できる（Ａｕｓｕｂｅｌら，１９９９同書、ｐ．７−５８〜７−６０を参照）。しかし、ＧＣＧ　Ｂｅｓｔｆｉｔプログラムを使用するのが好ましい。

【０１０９】

他の実施形態では、機能的同等物は、上述した配列のいずれかへ特異的にハイブリダイズすることができるであろう。１つの配列が別の配列にハイブリダイズできるかどうかを決定する方法は当技術分野において公知であり、例えばＳａｍｂｒｏｏｋ，ら（前出）およびＡｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ら（前出）に記載されている。非常に好ましい実施形態では、機能的同等物はストリンジェントな条件、例えば６５℃および０．１×ＳＳＣ｛１×ＳＳＣ＝０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０１５Ｍクエン酸三ナトリウム（ｐＨ７．０）｝の条件下でハイブリダイズ可能である。

【０１１０】

例えば、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース生成エキソアミラーゼおよびＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ非マルトース生成エキソアミラーゼに対する配列相同性を有する機能的同等物は、親酵素として使用するために適切である。そのような配列は、任意の１つ以上の位置でＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ配列と相違していてよい。さらに、ＡＴＣＣ１７６８６のようなシュードモナス種の他の菌株由来の非マルトース生成エキソアミラーゼもまた親ポリペプチドとして使用できる。ＰＳ４改変体ポリペプチド残基は、ＰＳ４改変体ポリペプチド配列を生成するためにこれらの親配列のいずれかに挿入することができる。

【０１１１】

ＰＳ４改変体ポリペプチドがさらに上述したような１つ以上の突然変異を含むことが所望される場合は、本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドを生成するための出発点もしくは親ポリペプチドとして使用できるようにするために、シュードモナス種の非マルトース生成エキソアミラーゼならびに「ＰＳ４ファミリー」の他のメンバーの機能的同等物の核酸配列内に対応する突然変異が作製され得ることは理解されるであろう。

【０１１２】

用語「ＰＳ４改変体ポリペプチド」の中には、特別には以下の中で開示されたポリペプチドが含まれる：

ＵＳ６０／４８５，４１３，６０／４８５，５３９および６０／４８５，６１６；ＰＣＴ／ＵＳ２００４／０２１７２３およびＰＣＴ／ＵＳ２００４／０２１７３９；ＵＳ１０／８８６，９０５および１０／８６６，９０３；ＵＳ６０／６０８，９１９；ＵＳ６０／６１２，４０７；ＵＳ６０／４８５，５３９；ＰＣＴ／ＩＢ２００４／００２４８７；ＵＳ１０／８８６，０２３；ＵＳ１０／８８６，５０５，ＵＳ１０／８８６，５２７およびＵＳ１０／８８６，５０４；ＵＳ１０／９４７，６１２。

【０１１３】

そのようなポリペプチドは、本明細書に記載した用途において使用するために、特に、食品添加物として、本明細書に記載のようにデンプンを処理するため、食品を製造するため、ベーカリー製品を製造するため、改善剤組成物を調製するため、組み合わせを調製するためなどに適切である。

【０１１４】

（親配列の改変）

親酵素は、本明細書に記載したＰＳ４改変体配列を生成するためにアミノ酸レベルまたは核酸レベルで改変できる。従って、本発明者らは非マルトース生成エキソアミラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列内に１つ以上の対応するコドン変化を導入する工程によるＰＳ４改変体ポリペプチドの生成を提供する。

【０１１５】

核酸番号付けについては、好ましくは、配列番号６として示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼヌクレオチド配列の位置の番号付けを参照されたい。または、あるいは追加して、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｘ１６

７３２を備える配列を参照されたい。好ましい実施形態では、核酸番号付けは、配列番号６として示したヌクレオチド配列を参照されたい。しかし、アミノ酸残基番号付けと同様に、この配列の残基番号付けは参照のためだけに使用されなければならない。特に、上記のコドン変化は任意のＰＳ４ファミリー核酸配列内に作製できることは理解されるであろう。例えば、配列変化は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース生成エキソアミラーゼまたはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ非マルトース生成エキソアミラーゼの核酸配列（例、Ｘ１６７３２、配列番号６またはＭ２４５１６、配列番号１２）に対して行うことができる。

【０１１６】

親酵素は、「完全な」、すなわちそれが天然に存在する（または突然変異した）全長を備える酵素を含んでいてもよく、またはその短縮形態を含んでいてよい。したがってそのような酵素に由来するＰＳ４改変体は、短縮形態であっても、または「全長」であってもよい。短縮は、Ｎ末端にあっても、Ｃ末端にあってもよいが、好ましくはＣ末端にある。親酵素もしくはＰＳ４改変体は、活性であるか活性でないかなどにかかわらず、サブ配列、シグナル配列、ドメインもしくは部分のように、１つ以上の部分が欠如していてもよい。例えば、親酵素もしくはＰＳ４改変体ポリペプチドは、上述したようなシグナル配列が欠如していてもよい。または、あるいは追加して、親酵素もしくはＰＳ４改変体は１つ以上の触媒ドメインもしくは結合ドメインが欠如していてもよい。

【０１１７】

非常に好ましい実施形態では、親酵素もしくはＰＳ４改変体は、非マルトース生成エキソアミラーゼ中に存在する１つ以上のドメイン（例えばデンプン結合ドメイン）が欠如していてもよい。例えば、ＰＳ４ポリペプチドは、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ非マルトース生成エキソアミラーゼの番号付けと比較して、４２９位までの配列しか有していない。これは、ＰＳ４改変体ｐＳａｃ－ｄ３４、ｐＳａｃ－Ｄ２０およびｐＳａｃ－Ｄ１４についても当てはまることに留意されたい。

【０１１８】

他の実施形態では、親酵素もしくはＰＳ４改変体は、Ｎ末端もしくはＣ末端での１つ以上のさらなるアミノ酸配列と一緒に、「完全な」酵素（すなわち、それが天然に存在する（または突然変異したとおりの）全長の酵素）を含み得る。例えば、親酵素もしくはＰＳ４改変体ポリペプチドは、Ｃ末端もしくはＮ末端においてさらなる単一のアミノ酸残基、例えば、Ｍ、Ａ、Ｇなどを含み得る。好ましくは、さらなるアミノ酸残基は、Ｎ末端に存在する。１つ以上のさらなる残基が含まれる場合は、位置の番号付けは付加の長さによって補正される。

【０１１９】

（アミラーゼ）

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、一般にアミラーゼ活性を含んでいる。

【０１２０】

用語「アミラーゼ」は、例えば、特にデンプンの分解を触媒できる酵素として、通常の意味で使用される。特に、アミラーゼは、デンプン中のα－Ｄ－（１→４）Ｏ－グリコシド結合を開裂できるヒドロラーゼである。

【０１２１】

アミラーゼは、デンプン中のα－Ｄ－（１→４）Ｏ－グリコシド結合を開裂するヒドロラーゼとして分類される、デンプン分解酵素である。一般に、αアミラーゼ（Ｅ．Ｃ．３．２．１．１、α－Ｄ－（１→４）－グルカングルカノヒドロラーゼ）は、無作為方法でデンプン分子内のα－Ｄ－（１→４）Ｏ－グリコシド結合を開裂するエンド作用型酵素であると規定されている。対照的に、βアミラーゼ（Ｅ．Ｃ．３．２．１．２、α－Ｄ－（１→４）－グルカンマルトヒドロラーゼ）、およびマルトース生成αアミラーゼ（Ｅ．Ｃ．３．２．１．１３３）のような一部の生成物特異的アミラーゼのようなエキソ作用型のデンプン分解酵素は、基質の非還元末端からデンプン分子を開裂する。βアミラーゼ、αグルコシダーゼ（Ｅ．Ｃ．３．２．１．２０、α－Ｄ－グルコシドグルコヒドロラーゼ）

、グルコアミラーゼ（Ｅ．Ｃ．３．２．１．３、α－Ｄ－（１→４）－グルカングルコヒドロラーゼ）、および生成物特異的アミラーゼは、デンプンから特定長さのマルトオリゴ糖を生成できる。

【０１２２】

（非マルトース生成エキソアミラーゼ）

本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドは、好ましくは非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を示すポリペプチド（またはその改変体）から誘導される。好ましくは、これらの親酵素は、非マルトース生成エキソアミラーゼ自体である。非常に好ましい実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチド自体も、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を示す。

【０１２３】

非常に好ましい実施形態では、本明細書で使用する用語「非マルトース生成エキソアミラーゼ酵素」は、この酵素が本明細書に記載した生成物決定方法にしたがって分析した場合に、最初はデンプンを実質的な量のマルトースへ分解しないことを意味すると理解されたい。

【０１２４】

非常に好ましい実施形態では、非マルトース生成エキソアミラーゼは、エキソ－マルトテトラヒドロラーゼを含んでいる。エキソ－マルトテトラヒドロラーゼ（Ｅ．Ｃ．３．２．１．６０）は、より正式にはグルカン１，４－α－マルトテトラヒドロラーゼとして公知である。この酵素は、非還元連鎖端から連続するマルトテトラオース残基を除去できるように、デンプン質多糖中の１，４－α－Ｄ－グルコシド結合を加水分解する。

【０１２５】

非マルトース生成エキソアミラーゼは、参考として本明細書中に援用される米国特許第６，６６７，０６５号の中に詳細に記載されている。

【０１２６】

（非マルトース生成エキソアミラーゼ活性についてのアッセイ）

以下のシステムは、本明細書に記載した方法および組成物によって使用するために適切な非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有するポリペプチドを性質決定するために使用される。このシステムは、例えば、本明細書に記載したＰＳ４親ポリペプチドもしくは改変体ポリペプチドを性質決定するために使用できる。

【０１２７】

最初に背景情報として、ろう様トウモロコシアミロペクチン（フランス国、Ｒｏｑｕｅｔｔｅ社からＷＡＸＩＬＹＳ　２００として入手できる）は、極めて高いアミロペクチン含量（９０％超）を備えるデンプンである。２０ｍｇ／ｍｌのろう様トウモロコシデンプンを５０ｍＭのＭＥＳ（２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸）、２ｍＭの塩化カルシウム（ｐＨ６．０）のバッファー中で３分間沸騰させ、引き続いて５０℃でインキュベートし、その後３０分間以内に使用する。

【０１２８】

１単位の非マルトース生成エキソアミラーゼは、上述したように調製した５０ｍＭのＭＥＳ、２ｍＭの塩化カルシウム（ｐＨ６．０）中の１０ｍｇ／ｍｌのろう様トウモロコシデンプン４ｍｌとともに５０℃の試験管中でインキュベートした場合に１分あたり１μｍｏｌの還元糖と同等である加水分解産物を放出する酵素の量であると規定されている。還元糖は、標準物質としてマルトースを用い、Ｂｅｒｎｆｅｌｄ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ，（１９５４），１，１４９－１５８のジニトロサリチル酸法または還元糖を定量するために当技術分野において公知であるまた別の方法を使用して測定する。

【０１２９】

非マルトース生成エキソアミラーゼの加水分解産物パターンは、０．７単位の非マルトース生成エキソアミラーゼを上述したように調製したバッファー中の１０ｍｇ／ｍｌのろう様トウモロコシデンプン４ｍｌとともに５０℃の試験管中で１５分間もしくは３００分間にわたりインキュベートすることによって決定する。反応は、試験管を沸騰水浴中に３

分間浸漬することによって停止させる。
【０１３０】
加水分解産物は、パルス式電流測定検出により、標準物質としてグルコースからマルトヘプタオースまでの公知の直鎖状マルトオリゴ糖を用いて、溶離液として酢酸ナトリウム、水酸化ナトリウムおよび水を用いるＤｉｏｎｅｘ　ＰＡ　１００カラムを使用するアニオン交換ＨＰＬＣによって分析および定量する。マルトオクタオースからマルトデカオースへの反応因子は、マルトヘプタオースについて見いだされる反応因子である。
【０１３１】
好ましくは、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、前記非マルトース生成エキソアミラーゼの０．７単位の量を、５０ｍＭの２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸および２ｍＭの塩化カルシウムを含有するバッファー液１ｍｌにつき事前に沸騰させたろう様トウモロコシデンプン１０ｍｇの水溶液４ｍｌ（ｐＨ６．０）中で５０℃の温度で１５分間にわたりインキュベートすると、その酵素は２～１０のＤ－グルコピラノシル単位からなる１つ以上の直鎖状マルトオリゴ糖および任意でグルコースからなる加水分解産物を産生する（少なくとも６０重量％、好ましくは少なくとも７０重量％、より好ましくは少なくとも８０重量％、および最も好ましくは少なくとも８５重量％の前記加水分解産物が、３～１０のＤ－グルコピラノシル単位、好ましくは４～８のＤ－グルコピラノシル単位からなる直鎖状マルトオリゴ糖である）ように、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する。
【０１３２】
容易に参照するため、および今回の目的のために、５０ｍＭの２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸および２ｍＭの塩化カルシウムを含有するバッファー溶液１ｍｌにつき１０ｍｇの事前に沸騰させたろう様トウモロコシデンプンを含む水溶液４ｍｌ（ｐＨ６．０）中での温度５０℃での１５分間にわたり０．７単位の非マルトース生成エキソアミラーゼをインキュベートする工程の特徴は、「ろう様トウモロコシデンプンインキュベーション試験」と呼ぶことができる。
【０１３３】
従って、また別の表現をすると、非マルトース生成エキソアミラーゼである好ましいＰＳ４改変体ポリペプチドは、トウモロコシデンプンインキュベーション試験において、１～１０のＤ－グルコピラノシル単位の１つ以上の直鎖状マルトオリゴ糖、および任意でグルコースからなる加水分解産物（前記加水分解産物の少なくとも６０重量％、好ましくは少なくとも７０重量％、より好ましくは少なくとも８０重量％、および最も好ましくは少なくとも８５重量％が１～１０のＤ－グルコピラノシル単位の直鎖状マルトオリゴ糖、好ましくは４～８のＤ－グルコピラノシル単位からなる直鎖状マルトオリゴ糖からなる）を産生する能力を有すると特徴付けられる。
【０１３４】
ろう様トウモロコシデンプンインキュベーション試験における加水分解産物は、２～１０のＤ－グルコピラノシル単位の１つ以上の直鎖状マルトオリゴ糖および任意でグルコースを含むことができる。ろう様トウモロコシデンプンインキュベーション試験における加水分解産物はまた、他の加水分解産物を含むこともできる。しかし、３～１０のＤ－グルコピラノシル単位の直鎖状マルトオリゴ糖の重量％は、２～１０のＤ－グルコピラノシル単位の１つ以上の直鎖状マルトオリゴ糖および任意のグルコースからなる加水分解産物の量に基づいている。言い換えると、３～１０のＤ－グルコピラノシル単位の直鎖状マルトオリゴ糖の重量％は、２～１０のＤ－グルコピラノシル単位の１つ以上の直鎖状マルトオリゴ糖およびグルコース以外の加水分解産物の量には基づいていない。
【０１３５】
加水分解産物は、任意の適切な手段によって分析できる。例えば、加水分解産物は、パルス式電流測定検出により、例えば標準物質としてグルコースからマルトヘプタオースまでの公知の直鎖状マルトオリゴ糖を用いて、Ｄｉｏｎｅｘ　ＰＡ　１００カラムを使用するアニオン交換ＨＰＬＣによって分析することができる。
【０１３６】

容易に参照するため、および今回の目的のために、パルス式電流測定検出により、標準物質として使用するグルコースからマルトヘプタオースまでの公知の直鎖状マルトオリゴ糖を用いて、Ｄｉｏｎｅｘ　ＰＡ　１００カラムを用いるアニオン交換ＨＰＬＣを使用して加水分解産物を分析する特徴は、「アニオン交換により分析する工程」と呼ぶことができる。当然ながら、そして先に指示したように、他の分析技術、ならびに他の特定のアニオン交換技術もまた有用であろう。

【０１３７】

従って、また別の表現をすると、好ましいＰＳ４改変体ポリペプチドは、ろう様トウモロコシデンプンインキュベーション試験において、２～１０のＤ－グルコピラノシル単位の１つ以上の直鎖状マルトオリゴ糖および任意でグルコースからなる加水分解産物を産生する能力を有するような非マルトース生成エキソアミラーゼを有するが、前記加水分解産物は、アニオン交換によって、前記加水分解産物の少なくとも６０重量％、好ましくは少なくとも７０重量％、より好ましくは少なくとも８０重量％、および最も好ましくは少なくとも８５重量％が３～１０のＤ－グルコピラノシル単位の直鎖状マルトオリゴ糖からなり、好ましくは４～８のＤ－グルコピラノシル単位からなる直鎖状マルトオリゴ糖からなる、と特徴付けられる。

【０１３８】

本明細書で使用する用語「直鎖状マルトオリゴ糖」は、α－（１→４）結合によって結合された２～１０単位のα－Ｄ－グルコピラノースを意味する通常の意味で使用される。

【０１３９】

非常に好ましい実施形態では、本明細書に記載したＰＳ４ポリペプチドは、親ポリペプチドと比較した場合に、好ましくは同一条件下で試験した場合に、改善されたエキソアミラーゼ活性、好ましくは非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する。特に、非常に好ましい実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、好ましくはろう様トウモロコシデンプン試験において測定した場合に、それらの親と比較して、１０％以上、好ましくは２０％以上、好ましくは５０％以上のエキソアミラーゼ活性を有する。

【０１４０】

加水分解産物は、任意の適切な手段によって分析できる。例えば、加水分解産物は、パルス式電流測定検出により、例えば標準物質としてグルコースからマルトヘプタオースまでの公知の直鎖状マルトオリゴ糖を用いて、Ｄｉｏｎｅｘ　ＰＡ　１００カラムを使用するアニオン交換ＨＰＬＣによって分析することができる。

【０１４１】

本明細書で使用する用語「直鎖状マルトオリゴ糖」は、α－（１→４）結合によって結合された２～２０単位のα－Ｄ－グルコピラノースを意味する通常の意味で使用される。

【０１４２】

（改善された特性）

本明細書に記載したＰＳ４改変体は、好ましくは、それらの親酵素と比較した場合に、改善された熱安定性、改善されたｐＨ安定性、または改善されたエキソ特異性などのうちの任意の１つ以上の改善された特性を有する。

【０１４３】

特に、３０３位における突然変異、例えば３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔおよび３０６Ｇを有するＰＳ４改変体ポリペプチドは、上昇されたエキソ特異性を有する。１４６位、１５７位、１５８位、１９８位、２２９位、（好ましくは１９８位および２２９位の両方）、３０９位、３１６位、３１６位および３５３位のうちの任意の位置での突然変異、例えば、１４６Ｇ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１９８Ｗ、２２９Ｐ、（１９８Ｗ、２２９Ｐ）、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐおよび３５３Ｔを有するＰＳ４改変体ポリペプチドは、改善された熱安定性を示す。

【０１４４】

いかなる特定の理論に縛られることも望まないが、本発明者らは、特定位置における突然変異は、そのような突然変異を含むポリペプチドの特性に個々の作用および累積作用を

及ぼすと考える。

【０１４５】

（熱安定性およびｐＨ安定性）

好ましくは、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、熱安定性である；好ましくは、ＰＳ４改変体ポリペプチドはその親酵素より高い熱安定性を有する。

【０１４６】

従って、本発明者らは、同一条件下で試験した場合に親ポリペプチドまたは野生型ポリペプチドと比較して高い熱安定性を有するＰＳ４改変体ポリペプチドを提供する。具体的には、本発明者らは、１２１位、１４５位、１４６位、１５７位、１５８位、１８８位、１９８位、２２３位、２２９位、３１６位、３５３位のうちの任意の１つまたは複数での突然変異、より好ましくは１２１Ａ、１２１Ｄ、１２１Ｆ、１２１Ｈ、１２１Ｍ、１２１Ｗ、１２１Ｙ、１４５Ｄ、１４６Ｇ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１８８Ｈ、１８８Ｓ、１９８Ｗ、２２３Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ、２２３Ｒ、２２３Ｖ、２２９Ｐ、３１６Ｐ、３１６Ｓ、３５３Ｔのうちの任意の１つ以上の突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチドを提供する。

【０１４７】

小麦および他の穀類では、アミロペプチン内の外側鎖はＤＰ１２～１９の範囲内にある。非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有すると記載されたＰＳ４改変体ポリペプチドによるアミロペクチン側鎖の酵素加水分解は、それらの結晶化傾向を顕著に減少させることができる。

【０１４８】

ベーキング目的のために使用される小麦およびその他の穀類中のデンプンは、アミラーゼによる酵素の攻撃に一般に抵抗性であるデンプン顆粒の形態で存在する。従って、デンプンの変性は、主として損傷したデンプンに限定され、約６０℃で糊化が始まるまで生地の加工処理および初期のベーキング中は極めて緩徐に進行する。この結果として、高度の熱安定性を備えるアミラーゼだけがベーキング中にデンプンを効率的に変性させることができる。そして一般に、アミラーゼの効率は熱安定性の上昇に伴って上昇する。すなわち、熱安定性が高いほど酵素はベーキング中により長時間にわたり活性であり続けるので、したがってより高度の硬化防止作用を提供するであろう。

【０１４９】

したがって、食品に加工処理する任意の段階、例えばパンへのベーキング前、ベーキング中、ベーキング後にデンプンに添加する場合、本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドの使用は、老化を遅延または妨害または緩徐化することができる。以下ではそのような使用についてさらに詳細に記載する。

【０１５０】

本明細書で使用する用語「熱安定性」は、上昇した温度に曝露した後に酵素が活性を維持する能力に関する。好ましくは、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、約５５℃から約８０℃以上の温度でデンプンを分解させることができる。適切には、この酵素は、約９５℃までの温度に曝露した後にその活性を維持する。

【０１５１】

非マルトース生成エキソアミラーゼなどの酵素の熱安定性は、その半減期によって測定される。従って、本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドは、好ましくは５５℃から約９５℃以上、好ましくは約８０℃の上昇した温度で、親酵素と比較して好ましくは１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％以上延長された半減期を有する。

【０１５２】

本明細書で使用する半減期（ｔ１／２）は、規定加熱条件下で酵素活性の半分が不活化される時間（単位：分間）である。好ましい実施形態では、半減期は少なくとも８０℃でアッセイされる。好ましくは、サンプルは８０℃以上で１～１０分間加熱される。次いで、半減期の値は、本明細書に記載した方法のいずれかによって、残留アミラーゼ活性を測

定する工程によって計算される。好ましくは、半減期アッセイは、実施例においてより詳細に記載するように実施される。

【０１５３】

好ましくは、本明細書に記載したＰＳ４改変体は、ベーキング中に活性であり、約５５℃の温度で始まるデンプン顆粒の糊化中および糊化後にデンプンを加水分解する。熱安定性が高いほど非マルトース生成エキソアミラーゼは活性である時間が長くなり、したがってこの改変体が提供する硬化防止作用はより高くなるであろう。しかし、約８５℃より高い温度でのベーキング中には、酵素の不活化が起こる可能性がある。これが起こると、非マルトース生成エキソアミラーゼは次第に不活化され、最終のパンにおけるベーキングプロセス後には実質的に活性が残っていない。このため好ましくは、上述した使用に適切な非マルトース生成エキソアミラーゼは、５０℃より高く９８℃未満の最適温度を有する。

【０１５４】

本明細書に記載したＰＳ４改変体の熱安定性は、より熱安定性になるように、そして本明細書に記載した使用により適切なように操作したタンパク質を使用することによって改善できる；このため本発明者らは、タンパク質操作によってより熱安定性になるように改変されたＰＳ４改変体の使用を含んでいる。

【０１５５】

好ましくは、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、ｐＨ安定性である；より好ましくは、ＰＳ４改変体ポリペプチドはその同起源親酵素より高いｐＨ安定性を有する。本明細書で使用する用語「ｐＨ安定性」は、広範囲のｐＨにわたって酵素が活性を維持する能力に関する。好ましくは、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、約５～約１０．５のｐＨでデンプンを分解させることができる。１つの実施形態では、ｐＨ安定性の程度は、特定ｐＨ条件において酵素の半減期を測定することによってアッセイできる。また別の実施形態では、ｐＨ安定性の程度は、特定ｐＨ条件において酵素の活性または比活性を測定することによってアッセイできる。特定のｐＨ条件は、ｐＨ５～ｐＨ１０．５までの任意のｐＨであってもよい。

【０１５６】

従って、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、同一条件下で親ポリペプチドと比較した場合に（アッセイに依存して）より長い半減期、またはより高い活性を有し得る。ＰＳ４改変体ポリペプチドは、同一ｐＨ条件下でそれらの親ポリペプチドに比較した場合に、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％以上長い半減期を有し得る。または、あるいは追加して、それらは同一ｐＨ条件下で親ポリペプチドと比較した場合に、より高い活性を有し得る。

【０１５７】

（エキソ特異性）

一部の非マルトース生成エキソアミラーゼは、ある程度のエンドアミラーゼ活性を有する可能性があることは公知である。一部の場合には、エンドアミラーゼ活性は分枝状デキストリンの蓄積に起因して粘着性もしくはゴム状のクラムを生成することによって最終パン製品の品質に有害な影響を及ぼす可能性があるので、このタイプの活性を減少させるか、または排除する必要がある。

【０１５８】

本発明者らは、同一条件下で試験した場合に親ポリペプチドまたは野生型ポリペプチドと比較して高いエキソ特異性を有するＰＳ４改変体ポリペプチドを提供する。具体的には、本発明者らは、２６位、７０位、１２１位、１４５位、１６１位、２２３位、２２３位、３０３位、３０６位、３０９位、３３９位、３３９位のうちの任意の１つまたは複数での突然変異、より好ましくは２６Ｅ、７０Ｄ、１２１Ａ、１２１Ｄ、１２１Ｈ、１２１Ｍ、１２１Ｗ、１２１Ｙ、１４５Ｄ、１６１Ａ、２２３Ａ、２２３Ｅ、２２３Ｋ、２２３Ｒ、２２３Ｖ、３０３Ｄ、３０３Ｅ、３０６Ｇ、３０６Ｔ、３０９Ｐ、３３９Ａ、３３９Ｅのうちの任意の１つ以上の突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチドを提供する。

【０１５９】

エキソ特異性は、全アミラーゼ活性対全エンドアミラーゼ活性の比率を決定することによって有用に測定できる。この比率は、本明細書では「エキソ特異性指数」と呼ばれる。好ましい実施形態では、酵素は、２０以上のエキソ特異性指数を有する場合、すなわちその全アミラーゼ活性（エキソアミラーゼ活性を含む）がそのエンドアミラーゼ活性の２０倍以上である場合は、エキソアミラーゼであると見なされる。非常に好ましい実施形態では、エキソアミラーゼのエキソ特異性指数は、３０以上、４０以上、５０以上、６０以上、７０以上、８０以上、９０以上、または１００以上である。非常に好ましい実施形態では、エキソ特異性指数は、１５０以上、２００以上、３００以上、４００以上、５００以上または６００以上である。

【０１６０】

全アミラーゼ活性およびエンドアミラーゼ活性は、当技術分野において公知である任意の手段によって測定できる。例えば、全アミラーゼ活性は、デンプン基質から遊離した還元末端の総数をアッセイすることによって測定できる。または、Ｂｅｔａｍｙｌアッセイの使用については実施例においてさらに詳細に記載されており、便宜性のために、実施例においてアッセイしたアミラーゼ活性は、表の中の「Ｂｅｔａｍｙｌ単位」によって記載されている。

【０１６１】

エンドアミラーゼ活性は、Ｐｈａｄｅｂａｓキット（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　ａｎｄ　Ｕｐｊｏｈｎ）を使用してアッセイできる。これは、（アゾ色素によって標識されている）青色標識架橋デンプン（デンプン分子内の内部切断だけが標識を遊離し、外部切断は標識を遊離しない）を利用する。色素の遊離は、分光測光法によって測定できる。したがって、Ｐｈａｄｅｂａｓキットはエンドアミラーゼ活性を測定し、便宜性のために、そのようなアッセイの結果（実施例に記載）は、本明細書では「Ｐｈａｄｅｂａｓ単位」と呼ばれる。

【０１６２】

このため非常に好ましい実施形態では、エキソ特異性指数は、Ｂｅｔａｍｙｌ単位／Ｐｈａｄｅｂａｓ単位によって表示され、したがって「Ｂ／Ｐｈａｄ」と呼ばれる。

【０１６３】

エキソ特異性は、例えば本発明者らの国際特許公開第ＷＯ９９／５０３９９号におけるように、先行技術において記載された方法によってアッセイすることもできる。これは、エンドアミラーゼ活性対エキソアミラーゼ活性の比率によってエキソ特異性を測定する。従って、好ましい態様では、本明細書に記載したＰＳ４改変体は、１単位のエキソアミラーゼ活性あたり０．５未満のエンドアミラーゼ単位（ＥＡＵ）を有するであろう。好ましくは、本発明によって使用するために適切な非マルトース生成エキソアミラーゼは、１単位のエキソアミラーゼ活性あたり０．０５ＥＡＵ未満、より好ましくは１単位のエキソアミラーゼ活性あたり０．０１ＥＡＵ未満を有するであろう。

【０１６４】

本明細書に記載したＰＳ４改変体は、好ましくは、上述したように、例えばエキソ特異性指数によって測定したエキソ特異性を有し、エキソアミラーゼであることと一致する。さらに、ＰＳ４改変体は、好ましくは、ＰＳ４改変体が誘導された親酵素もしくはポリペプチドと比較した場合に、より高い、または上昇したエキソ特異性を有する。そこで、例えば、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、好ましくは同一ｐＨ条件下で、それらの親ポリペプチドと比較した場合に、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％以上高いエキソ特異性を有していてよい。それらは、好ましくは同一条件下で、それらの親ポリペプチドに比較した場合に、１．５倍以上、２倍以上、５倍以上、１０倍以上、５０倍以上、１００倍以上を有するであろう。

【０１６５】

（ＰＳ４改変体ポリペプチドおよびＰＳ４改変体核酸の使用）

ＰＳ４改変体ポリペプチド、核酸、宿主細胞、発現ベクターなどは、アミラーゼを使用できる任意の用途において使用できる。特に、それらは任意の非マルトース生成エキソア

ミラーゼにの代わりに使用できる。それらは、単独であるか、他の公知のアミラーゼまたは非マルトース生成エキソアミラーゼと組み合わせられるかにかかわらず、アミラーゼまたは非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を補充するために使用できる。

【０１６６】

本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドは、例えばベーカリー製品および飲料製品などの食品工業における様々な用途において使用することができ、それらは医薬組成物などの他の用途または化学工業においてさえ使用することもできる。特に、ＰＳ４改変体ポリペプチドおよびＰＳ４改変体核酸は、ベーキング（ＷＯ９９／５０３９９に開示されている）および粉標準化（量の増強もしくは改善）を含む様々な工業用途において有用である。ＰＳ４改変体ポリペプチドは、デンプンおよびその他の基質からマルトテトラオースを生成するために使用できる。

【０１６７】

このため本発明者らは、食品を調製するための方法であって：（ａ）非マルトース生成エキソアミラーゼを得る工程と；（ｂ）本明細書に記載した非マルトース生成エキソアミラーゼの任意の１つ以上の位置で突然変異を導入する工程と；（ｃ）結果として生じたポリペプチドを食品成分と混合する工程と、を包含する方法について記載する。

【０１６８】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、パンなどのベーカリー製品の容積を増加させるために使用できる。いかなる特定の理論に縛られることも望まないが、本発明者らは、これはアミロース分子を短縮するエキソアミラーゼの結果として加熱（ベーキングなど）中のパン生地の粘度における減少の結果として生じると考えている。これは、発酵によって生成した二酸化炭素がより妨害を受けずにパンのサイズを増加させることを可能にする。

【０１６９】

従って、ＰＳ４改変体ポリペプチドを含む食品、またはＰＳ４改変体ポリペプチドで処理された食品は、そのように処理されていない製品、または親ポリペプチドを用いて処理されている製品と比較した場合に容積が増加している。言い換えると、この食品は、食品の容積あたりでより大きな容積の空気を有している。または、あるいは追加して、ＰＳ４改変体ポリペプチドを用いて処理された食品は、より低い密度、または重量（もしくは質量）／容積比を有している。特に好ましい実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、パンの容積を増加させるために使用される。容積の増加もしくは拡大は、食品の粘着性またはデンプン質を低下させるので有益である。消費者には軽い食品が好まれており、顧客の経験は強化されている。好ましい実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチドの使用は、容積を１０％、２０％、３０％、４０％、５０％以上増加させる。

【０１７０】

食品の容積を増加させるためのＰＳ４改変体ポリペプチドの使用は、実施例に詳細に記載されている。

【０１７１】

（食品使用）

本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドおよびＰＳ４改変体核酸は、食品として、または食品の調製において使用できる。特に、それらは食品添加物として食品に添加できる。用語「食品」は、調製された食品、ならびに粉などの食品のための成分を含むことが意図されている。好ましい態様では、食品はヒトが消費するためのものである。食品は、使用および／または適用様式および／または投与様式に依存して、溶液もしくは固体の形態であってもよい。

【０１７２】

ＰＳ４改変体ポリペプチドおよびＰＳ４改変体核酸は、食品成分として使用されてもよい。本明細書で使用する用語「食品成分」は、機能的食品もしくは食材に添加される、もしくは添加できる調製物を含んでおり、さらに例えば酸化もしくは乳化を必要とする広範囲の製品において低レベルで使用できる調製物を含んでいる。食品成分は、使用および／または適用様式および／または投与様式に依存して、溶液もしくは固体の形態であっても

よい。

【０１７３】

本明細書に開示したＰＳ４改変体ポリペプチドおよびＰＳ４改変体核酸は、栄養補助食品であってもよく、または栄養補助食品に添加されてもよい。本明細書に開示したＰＳ４改変体ポリペプチドおよびＰＳ４改変体核酸は、機能的食品であってもよく、または機能的食品に添加されてよい。本明細書で使用する用語「機能的食品」は、栄養作用および／または味覚の充足を提供できるだけではなく、消費者へいっそう有益な作用を送達できる食品を意味する。機能的食品の法的定義はないが、この分野に関心を抱いている関係者の大多数は、それらが特定の健康作用を有するとして市販される食品であることを承知している。

【０１７４】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、食品または食材を製造する際に使用することもできる。典型的な食材には、乳製品、肉製品、家禽肉製品、魚加工品および生地製品が含まれる。生地製品は、揚げた生地、たっぷりの油で揚げた（ｄｅｅｐ　ｆｒｉｅｄ）生地、ローストした生地、ベーキングした生地、蒸した生地および茹でた生地（例えば、蒸しパンや餅）を含む任意の加工生地製品であってもよい。非常に好ましい実施形態では、食品はベーカリー製品である。

【０１７５】

好ましくは、食材は、ベーカリー製品である。典型的には、ベーカリー（ベーキング）製品には、ローフパン、ロールパン、丸パン、ピザベースなどのパン、ペストリー、プレッツェル、トーティーヤ、ケーキ、クッキー、ビスケット、クラッカーなどが含まれる。

【０１７６】

このため本発明者らは、非マルトース生成エキソアミラーゼを含む食品添加物を改変する方法であって、本明細書に記載したように非マルトース生成エキソアミラーゼの任意の１つ以上の位置で突然変異を導入する工程を含む方法について記載する。同一の方法は、食品成分、または栄養補助食品、食品、または食材を変性させるために使用できる。

【０１７７】

（老化／硬化）

本発明者らは、デンプンゲルなどのデンプン媒質の硬化を遅延させることのできるＰＳ４改変体タンパク質の使用について記載する。ＰＳ４改変体ポリペプチドは、特別にはデンプンの有害な老化を遅延させることができる。

【０１７８】

ほとんどのデンプン顆粒は、２種のポリマーである本質的に直鎖状のアミロースおよび高度に分枝状のアミロペクチンの混合物から構成される。アミロペクチンは、（１－４）結合によって連結されたα－Ｄ－グルコピラノシル単位の鎖からなる極めて大きな分枝状分子であり、ここで、前記鎖はα－Ｄ－（１－６）結合によって連結されて分枝鎖を形成する。アミロペクチンは、すべての天然デンプン中に存在し、ほとんどの一般的デンプンの約７５％を構成している。アミロースは、本質的にはほとんどα－Ｄ－（１－６）分枝鎖を有さない（１－４）結合α－Ｄ－グルコピラノシル単位の直鎖である。ほとんどのデンプンは約２５％のアミロースを含有している。

【０１７９】

水の存在下で加熱されたデンプン顆粒は、糊化と呼ばれる秩序－無秩序相転移を受けるが、ここで、液体は膨潤顆粒によって取り込まれる。ゲル化温度は、様々なデンプン毎に相違する。新しくベーキングされたパンが冷めると、アミロース分画は数時間以内に老化して網状組織を発生させる。このプロセスは、それが低度の堅さと改善されたスライシング特性を備える望ましいクラムの構造を作り出す点で有益である。ゲル化したデンプン顆粒内で起こるアミロペクチンの結晶化は、ベーキング後数日間はより緩やかに発生する。このプロセスでは、アミロペクチンは、デンプン顆粒が埋め込まれているアミロース網状組織を強化すると考えられる。この強化は、クラムの堅さの上昇をもたらす。この強化は、パン硬化の主因の１つである。

【０１８０】
パン製品の品質は、保管中に徐々に悪化することは公知である。デンプンの再結晶化（老化とも呼ばれる）の結果として、クラムの水分保持能力は変化し、これは、感覚的および栄養的特性に重要な意味を伴う。クラムは柔らかさや弾力性を失い、堅くて砕けやすくなる。クラムの堅さの増加は、しばしばパンの硬化プロセスの尺度として使用されている。

【０１８１】
アミロペクチンの有害な老化の速度は、アミロペクチンの側鎖の長さに左右される。従って、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有するＰＳ４改変体ポリペプチドによるアミロペクチン側鎖の酵素加水分解は、それらの結晶化傾向を顕著に減少させることができる。

【０１８２】
したがって、食品に加工処理する任意の段階、例えばパンへのベーキング前、ベーキング中、ベーキング後にデンプンに添加する場合の本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドの使用は、老化を遅延または妨害または緩徐化することができる。以下ではそのような使用についてさらに詳細に記載する。

【０１８３】
このため本発明者らは、非マルトース生成エキソアミラーゼが生地製品の硬化を防止する能力、好ましくは有害な老化を防止する能力を向上させる方法であって、本明細書に記載したように非マルトース生成エキソアミラーゼの任意の１つ以上の位置で突然変異を導入する工程を含む方法について記載する。

【０１８４】
（老化（硬化を含む）を測定するためのアッセイ）
本明細書に記載した非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有するＰＳ４改変体ポリペプチドの硬化防止作用を評価するために、クラムの堅さは、Ｉｎｓｔｒｏｎ　４３０１万能食品テクスチャー分析装置または当技術分野において公知である類似の装置によって、ベーキングの１、３および７日後に測定できる。

【０１８５】
当技術分野において伝統的に使用されており、非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有するＰＳ４改変体ポリペプチドがデンプン老化に及ぼす作用を評価するために使用される別の方法は、ＤＳＣ（示差走査熱量測定法）に基づいている。ここで、酵素を用いるか、または用いずに（コントロール）、ベーキングしたクラムまたはモデル系の生地からのクラム内の老化したアミロペクチンの融解エンタルピーを測定する。本明細書に記載した実施例において適用したＤＳＣ装置は、２０～９５℃で１分あたり１０℃の温度勾配で実行されるＭｅｔｔｌｅｒ－Ｔｏｌｅｄｏ　ＤＳＣ　８２０である。サンプルを調製するためには、１０～２０ｍｇのクラムが計量され、Ｍｅｔｔｌｅｒ－Ｔｏｌｅｄｏアルミニウム皿へ移され、これが次に密封される。

【０１８６】
本明細書に記載した実施例で使用したモデル系の生地は、ＰＳ４改変体非マルトース生成エキソアミラーゼを含むか、または含まずに、標準的な小麦粉および最適な量の水もしくはバッファーを含有している。それらは、１０または５０ｇのＢｒａｂｅｎｄｅｒ　ファリノグラフ内で各々６もしくは７分間混合される。生地のサンプルは蓋付きのガラス製試験管（１５＊０．８ｃｍ）中に入れられる。これらの試験管は、水浴中で３３℃で３０分間のインキュベーションから開始して、次に１分あたり１．１℃の勾配で３３～９５℃への加熱、そして最後に９５℃での５分間のインキュベーションを行なうベーキングプロセスにかけられる。引き続き、試験管はＤＳＣ分析の前に２０℃の恒温槽内に保管される。

【０１８７】
好ましい実施形態では、本明細書に記載したＰＳ４改変体は、コントロールと比較して低下した融解エンタルピーを有している。非常に好ましい実施形態では、ＰＳ４改変体は

、１０％以上低下した融解エンタルピーを有している。好ましくは、それらは、コントロールと比較して２０％以上、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％以上低下した融解エンタルピーを有している。

【０１８８】

【化５】

	DSC (J/g)
コントロール	2,29
0,5 D34	1,91
1 D34	1,54
2 D34	1,14

表 2

上記の表２は、相違する用量のＰＳａｃ－Ｄ３４を用いて調製した生地モデル系の７日間の保管後のＤＳＣ値を示している。０．５、１および２ｐｐｍ（またはμｇ／ｇ）の粉が試験されている。

【０１８９】

（デンプン製品の調製）

本発明者らは、食品、特にデンプン製品の調製におけるＰＳ４改変体ポリペプチドの使用を提供する。本方法は、ＰＳ４改変体ポリペプチドなどの非マルトース生成エキソアミラーゼ酵素をデンプン媒質へ添加することによってデンプン製品を形成する工程を含んでいる。デンプン媒質が生地である場合は、生地は粉、水、ＰＳ４改変体ポリペプチドである非マルトース生成エキソアミラーゼおよび必要に応じて他の考えられる成分および添加物を一緒に混合することによって調製される。

【０１９０】

用語「デンプン」は、デンプン自体またはその構成成分、特にアミロペクチンを意味すると見なされたい。用語「デンプン媒質」は、デンプンを含む任意の適切な媒質を意味する。用語「デンプン製品」は、デンプンを含有するか、デンプンをベースとするか、またはデンプンから誘導される任意の製品を意味する。好ましくは、デンプン製品は、小麦粉から得られるデンプンを含有するか、これをベースとするか、またはこれから誘導される。本明細書で使用する用語「粉」は、小麦または他の穀物の微細に粉砕された粉の同義語である。しかし好ましくは、この用語は他の穀物からではなく小麦自体から得られた粉を意味する。従って、他に特別に明示しない限り、本明細書で使用する「粉」との言及は、好ましくは小麦粉自体ならびに生地などの媒質中に存在する場合の小麦粉についての言及を意味する。

【０１９１】

好ましい粉は、小麦粉またはライ麦粉または小麦粉とライ麦粉の混合物である。しかし、例えば米、トウモロコシ、大麦、およびアズキモロコシなどの他のタイプの穀物から作製された粉を含む生地もまた想定されている。好ましくは、デンプン製品は、ベーカリー製品である。より好ましくは、デンプン製品は、パン製品である。いっそうより好ましくは、デンプン製品は、ベーキングしたデンプン質のパン製品である。用語「ベーキングしたデンプン質のパン製品」は、生地形成条件下で粉、水、および膨張剤を混合する工程によって入手できる生地をベースとする任意のベーキング製品を意味する。当然ながら、生地混合物にはさらなる構成成分を添加することができる。

【０１９２】

従って、デンプン製品がベーキングしたデンプン質のパン製品である場合は、プロセスは、生地形成条件下で任意の適切な順序で粉、水および膨張剤を混合する工程およびさらに任意でプレミックスの形態にあるＰＳ４改変体ポリペプチドを添加する工程を含んでい

る。膨張剤は、重炭酸ナトリウムなどの化学膨張剤または任意の菌株のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ（パン酵母）であってもよい。

【０１９３】

ＰＳ４改変体非マルトース生成エキソアミラーゼは、水を含む任意の生地成分、もしくは生地成分混合物または任意の添加物もしくは添加物混合物と一緒に添加できる。生地は、ベーキング産業または粉生地をベースとする製品を製造する他の産業において一般的な任意の従来型生地調製方法によって調製できる。

【０１９４】

例えば白パン、ふるいにかけたライ麦粉と小麦粉とから作ったパン、ロールパンなどのデンプン質のパン製品のベーキングは、典型的には約１５～６０分間にわたり１８０～２５０℃の範囲内の温度のオーブンでパン生地をベーキングすることによって遂行される。ベーキングプロセス中には、急な温度勾配（２００→１２０℃）が外側生地層全体に広がり、ベーキング製品に特徴的なクラストが発生する。しかし、蒸気発生に起因する熱消費のために、クラム中の温度はベーキングプロセスの終了時においてもほぼ１００℃に過ぎない。

【０１９５】

このため本発明者らは、パン製品を製造する工程であって：（ａ）デンプン媒質を提供する工程と；（ｂ）本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドをデンプン媒質に添加する工程と；（ｃ）パン製品を製造するために工程（ｂ）中または後にデンプン媒質に熱を加える工程と、を包含するプロセスを提供する。本発明者らは、パン製品を製造するプロセスであって、本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドをデンプン媒質に添加する工程を含むプロセスについても記載する。

【０１９６】

ＰＳ４改変体ポリペプチドの非マルトース生成エキソアミラーゼは、単一活性成分として、または１つ以上のさらなる生地成分もしくは生地添加物と混合して該酵素を含む液体調製物、または乾燥粉末状組成物として添加できる。

【０１９７】

（改善剤組成物）

本発明者らは、パン改善剤組成物および生地改善剤組成物を含む改善剤組成物について記載する。これらは、必要に応じてさらなる成分と、もしくはさらなる酵素、またはその両方と一緒に、ＰＳ４改変体ポリペプチドを含んでいる。

【０１９８】

本発明者らは、ベーキング工程におけるそのようなパンおよび生地改善剤組成物の使用をさらに提供する。また別の態様では、本発明者らは、パン改善剤組成物および生地改善剤組成物から得られたベーキング製品または生地を提供する。また別の態様では、本発明者らは、パン改善剤組成物および生地改善剤組成物の使用から得たベーキング製品または生地について記載する。

【０１９９】

（生地調製物）

生地は、粉、水、ＰＳ４改変体ポリペプチド（上述したような）を含む生地改善剤組成物ならびに必要に応じて他の成分および添加物を混合する工程によって調製できる。

【０２００】

生地改善剤組成物は、粉、水、または任意の他の成分もしくは添加物を含む任意の生地成分と一緒に添加することができる。生地改善剤組成物は、粉もしくは水もしくは任意の他の成分および添加物の前に添加できる。生地改善剤組成物は、粉もしくは水もしくは任意の他の成分および添加物の後に添加できる。生地は、ベーキング産業または粉生地をベースとする製品を製造する他の産業において一般的な任意の従来型生地調製方法によって調製できる。

【０２０１】

生地改善剤組成物は、単一活性成分として、または１つ以上の他の生地成分もしくは添

加物と混合して該組成物を含む液状調製物または乾燥粉末組成物の形態で添加できる。

【０２０２】

添加されるＰＳ４改変体ポリペプチドの非マルトース生成エキソアミラーゼの量は、通常は粉１ｋｇに付き最終生地中に５０～１００，０００単位、好ましくは粉１ｋｇに付き１００～５０，０００単位の存在が生じる量である。好ましくは、この量は粉１ｋｇに付き２００～２０，０００単位の範囲内である。または、ＰＳ４改変体ポリペプチドの非マルトース生成エキソアミラーゼは、粉に基づいて最終生地中に０．０２～５０ｐｐｍ（粉１ｋｇに付き０．０２～５０ｍｇの酵素）、好ましくは０．２～１０ｐｐｍの存在が生じる量で添加される。

【０２０３】

本明細書の文脈では、１単位の非マルトース生成エキソアミラーゼは、以下で記載するように調製した５０ｍＭのＭＥＳ、２ｍＭの塩化カルシウム（ｐＨ６．０）中の１０ｍｇ／ｍｌのろう様トウモロコシデンプン４ｍｌとともに５０℃の試験管中でインキュベートした場合に１分あたり１μｍｏｌの還元糖と同等である加水分解産物を放出する酵素の量であると規定されている。

【０２０４】

本明細書に記載した生地は、一般に小麦ミールもしくは小麦粉および／またはコーンフラワー、コーンスターチ、メイズフラワー、米粉、ライミール、ライ麦粉、オート麦粉、オートミール、大豆粉、モロコシミール、モロコシフラワー、ポテトミール、ポテトフラワーもしくは馬鈴薯デンプンなどの他のタイプのミール、粉もしくはデンプンを含んでいる。生地は、生、冷凍、または部分ベーキングであってもよい。

【０２０５】

生地は、発酵済み生地または膨張工程を受けさせなければならない生地であってもよい。生地は、例えば重炭酸ナトリウムのような化学膨張剤を添加するか、または酵母を添加する（生地を発酵させる）ような様々な方法で膨張させることができるが、生地はＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ（パン酵母）（例えば購入できるＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅの菌株の培養物などの適切な酵母培養物を添加することによって膨張させるのが好ましい。

【０２０６】

生地は、顆粒状脂肪またはショートニングのような脂肪を含んでいてよい。生地は、モノもしくはジグリセリド、脂肪酸の糖エステル、脂肪酸のポリグリセロールエステル、モノグリセリドの乳酸エステル、モノグリセリドの酢酸エステル、ステアリン酸ポリオキシエチレン、またはリゾレシチンなどの別の乳化剤をさらに含んでいてよい。

【０２０７】

本発明者らは、本明細書に記載した組み合わせと一緒に粉を含むプレミックスについてもさらに記載する。プレミックスは、他の生地改善用および／またはパン改善用添加物（例えば上述した酵素を含む添加物）のいずれかを含有することができる。

【０２０８】

（また別の生地添加物または成分）

ベーキング製品の特性をさらに改善し、ベーキング製品に際立った品質を付与するために、さらなる生地成分および／または生地添加物を生地の中に組み込むことができる。典型的には、そのようなさらなる添加される成分は、塩、穀物、脂肪および油、糖もしくは甘味料、食物繊維などの生地成分、粉乳、グルテン大豆もしくは卵などのタンパク質源ならびに乳化剤、他の酵素、親水コロイド、フレーバー剤、酸化剤、ミネラルおよびビタミンなどの生地添加物を含むことができる。

【０２０９】

乳化剤は、生地強化剤およびクラム軟化剤として有用である。生地強化剤として、乳化剤は寝かせ時間に関する耐性およびホイロ中の耐衝撃性を提供できる。さらに、生地強化剤はまた、発酵時間の変動に対する所定の生地の耐性を向上させるであろう。大多数の生地強化剤は、ホイロ済み製品からベーキング製品への容積の増加を意味する釜のびもさら

に改善する。最後に、生地強化剤は、レシピ混合物中に存在する任意の脂肪を乳化するであろう。
【０２１０】
適切な乳化剤には、レシチン、ステアリン酸ポリオキシエチレン、食用脂肪酸のモノおよびジグリセリド、食用脂肪酸のモノおよびジグリセリドの乳酸エステル、食用脂肪酸のモノおよびジグリセリドのクエン酸エステル、食用脂肪酸のモノおよびジグリセリドのジアセチル酒石酸エステル、食用脂肪酸のスクロースエステル、ステアロイル－２－乳酸ナトリウム、およびステアロイル－２－乳酸カルシウムが含まれる。
【０２１１】
さらなる生地添加物もしくは生地成分を、粉、水、または任意の他の成分もしくは添加物を含む任意の生地成分、または生地改善剤組成物と一緒に添加することができる。さらなる生地添加物もしくは成分は、粉、水、または任意の他の成分および添加物または生地改善剤組成物の前に添加することができる。さらなる生地添加物もしくは成分は、粉、水、または任意の他の成分および添加物または生地改善剤組成物の後に添加することができる。
【０２１２】
さらなる生地添加物もしくは成分は、便利にも、液体調製物であってもよい。しかし、生地添加物もしくは成分は、便利にも、乾燥組成物の形態であってもよい。
【０２１３】
好ましくは、さらなる生地添加物もしくは成分は、生地の粉成分の重量の少なくとも１％である。より好ましくは、または生地添加物もしくは成分は、少なくとも２％、好ましくは少なくとも３％、好ましくは少なくとも４％、好ましくは少なくとも５％、好ましくは少なくとも６％である。添加物が脂肪の場合は、典型的には、脂肪は１～５％、典型的には１～３％、より典型的には約２％の量で存在していてよい。
【０２１４】
（さらなる酵素）
ＰＳ４改変体ポリペプチドに加えて、１つ以上の別の酵素を使用できる、例えば食品、生地調製物、食材またはデンプン組成物に添加することができる。
【０２１５】
生地に添加できるさらなる酵素には、オキシドレダクターゼ、例えばリパーゼおよびエステラーゼなどのヒドロラーゼならびにαアミラーゼ、プルラナーゼ、およびキシラナーゼなどのグリコシダーゼが含まれる。例えばグルコース酸化酵素およびヘキソース酸化酵素などのオキシドレダクターゼは、生地の強化およびベーキング製品の容積の調節に使用することができ、キシラナーゼおよび他のヘミセルラーゼは、生地取り扱い特性、クラムの柔らかさおよびパンの容積を改善するために添加できる。リパーゼは、生地強化剤およびクラム軟化剤として有用であり、αアミラーゼおよび他のデンプン分解酵素はパンの容積を調節し、さらにクラムの堅さを低下させるために生地の中に組み込むことができる。
【０２１６】
使用できるさらなる酵素は、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、デンプン分解酵素、プロテアーゼ、リポキシゲナーゼからなる群から選択できる。
【０２１７】
有用なオキシドレダクターゼの例には、マルトース酸化酵素、グルコース酸化酵素（ＥＣ１．１．３．４）、炭水化物酸化酵素、グリセロール酸化酵素、ピラノース酸化酵素、ガラクトース酸化酵素（ＥＣ１．１．３．１０）およびヘキソース酸化酵素（ＥＣ１．１．３．５）が含まれる。
【０２１８】
デンプン分解酵素の中では、アミラーゼが生地改善剤添加物として特に有用である。αアミラーゼはデンプンをデキストリンに分解し、これはさらにβアミラーゼによってマルトースへ分解される。生地組成物に添加できる他の有用なデンプン分解酵素には、グルコアミラーゼおよびプルラナーゼが含まれる。

【０２１９】
好ましくは、さらなる酵素は少なくともキシラナーゼおよび／または少なくともアミラーゼである。本明細書で使用する用語「キシラナーゼ」は、キシロシド結合を加水分解するキシラナーゼ（ＥＣ３．２．１．３２）を意味する。
【０２２０】
本明細書で使用する用語「アミラーゼ」は、αアミラーゼ（ＥＣ３．２．１．１）、βアミラーゼ（ＥＣ３．２．１．２）およびγアミラーゼ（ＥＣ３．２．１．３）などのアミラーゼを意味する。
【０２２１】
さらなる酵素は、粉、水、または任意の他の成分もしくは添加物を含む任意の生地成分、または生地改善剤組成物と一緒に添加することができる。さらなる酵素は、粉、水、および任意の他の成分および添加物または生地改善剤組成物の前に添加することができる。さらなる酵素は、粉、水、および任意の他の成分および添加物または生地改善剤組成物の後に添加することができる。さらなる酵素は、便利にも、液体調製物であってもよい。しかし、この組成物は、便利にも、乾燥組成物の形態であってもよい。
【０２２２】
生地改善剤組成物の一部の酵素は、粉生地の流動学的特性および／または機械加工特性および／または酵素による、生地から製造される製品の品質の改善に及ぼす作用が、相加的であるのみならず、相乗的である程度まで、生地条件下で相互に相互作用することができる。
【０２２３】
生地から製造された製品（最終製品）の改善に関連して、これらの組み合わせがクラム構造に関して実質的な相乗作用を生じさせることを見いだすことができる。さらに、ベーキング製品の特定の容積に関しても、相乗作用を見いだすことができる。
【０２２４】
さらなる酵素は、カルボン酸エステル結合を加水分解してカルボキシレートを遊離させることのできるリパーゼ（ＥＣ３．１．１）であってもよい。リパーゼの例には、トリアシルグリセロールリパーゼ（ＥＣ３．１．１．３）、ガラクトリパーゼ（ＥＣ３．１．１．２６）、ホスホリパーゼＡ１（ＥＣ３．１．１．３２）、ホスホリパーゼＡ２（ＥＣ３．１．１．４）およびリポタンパク質リパーゼＡ２（ＥＣ３．１．１．３４）が含まれるがそれらに限定されない。
【０２２５】
（その他の使用）
ＰＳ４改変体は、マルトースおよび高マルトースシロップを製造するために適切である。そのような生成物は、マルトースの低吸湿性、低粘性、良好な熱安定性およびマイルドで甘すぎない味のために、所定の菓子類の製造においては相当に関心が高い。マルトースシロップを製造する工業プロセスは、デンプンを液化する工程、次にマルトース産生酵素および必要に応じてアミロペクチン内の１．６分岐点を開裂する酵素（例えばα－１．６－アミログルコシダーゼ）を用いる糖化する工程を含んでいる。
【０２２６】
本明細書に記載したＰＳ４改変体は、洗剤組成物に添加することができる、したがって洗剤組成物の構成成分にすることができる。洗剤組成物は、例えば、染みの付いた衣類の前処置に適切な洗濯用添加物組成物および織物柔軟仕上げ剤組成物を含む手洗い用もしくは洗濯機用洗剤組成物として調製できるか、または一般的な家事での塗装面を洗浄する作業に使う洗剤組成物として調製できるか、または食器洗い用もしくは食器洗浄機用洗剤として調製できる。特定の態様では、本発明者らは、ＰＳ４改変体を含む洗剤添加物について記載する。洗剤添加物ならびに洗剤組成物は、プロテアーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、カルホヒドラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、マンナナーゼ、アラビナーゼ、ガラクタナーゼ、キシラナーゼ、オキシダーゼ、例えばラッカーゼ、および／またはペルオキシダーゼなどの１つ以上の他の酵素を含んでいてよい。一般に、選択された酵素

の特性は選択された洗剤と適合しなければならず（すなわち、ｐＨ至適値、他の酵素成分および非酵素成分との適合性など）、そして酵素は有効量で存在しなければならない。

【０２２７】

ＰＳ４改変体はまた、特に再パルプ化が７を超えるｐＨで発生し、そしてアミラーゼが強化デンプンの分解を通して古紙材料の崩壊を促進できる場合に、デンプン強化古紙およびボール紙からのパルプ、紙およびボール紙などのリグノセルロース材料の製造において使用することができる。ＰＳ４改変体は、デンプン被覆印刷紙から製紙用パルプを製造するためのプロセスにおいて特に有用である。このプロセスは、ＷＯ９５／１４８０７に記載されたように実施することができ、ａ）パルプを製造するために紙を崩壊させる工程と、ｂ）工程ａ）の前、中または後にデンプン分解酵素を用いて処理する工程と、ｃ）工程ａ）およびｂ）の後にパルプからインク粒子を分離する工程と、を包含する。ＰＳ４改変体はさらに、製紙工程において酵素的に改変されたデンプンが炭酸カルシウム、陶土および粘土などのアルカリ性充填剤と一緒に使用される場合に、デンプンを改変する際に極めて有用である。本明細書に記載したＰＳ４改変体を用いると、充填剤の存在下でデンプンを改変することが可能になるので、したがってより単純な統合プロセスが可能になる。ＰＳ４改変体はまた、織物の糊抜きにおいても極めて有用な場合がある。織物加工業では、アミラーゼは製織中に横糸への保護コーティング剤として機能していたデンプン含有糊の除去を容易にするための糊抜きプロセスにおける助剤として伝統的に使用されている。製織後の糊コーティング剤の完全な除去は、織物が洗い上げられ、漂白され、そして乾燥させられるその後のプロセスにおける最適な結果を保証するために重要である。酵素によるデンプン分解は、繊維材料に何の有害な作用も及ぼさないので、好ましい。ＰＳ４改変体は、単独で、またはセルロース含有織物もしくは布地を糊抜きする場合はセルラーゼと組み合わせて使用できる。

【０２２８】

ＰＳ４改変体はまた、デンプンから甘味料を製造するための精選アミラーゼであってもよい。デンプンからフルクトースシロップへ転換させるための「伝統的」プロセスは、通常は３つの連続する酵素プロセス、すなわち液化プロセス、次に糖化プロセスおよび異性化プロセスからなる。液化プロセス中、デンプンは５．５～６．２のｐＨ値および９５～１６０℃の温度で、約２時間にわたってアミラーゼによってデキストリンへ分解される。これらの条件下で最適の酵素安定性を保証するために、１ｍＭのカルシウム（４０ｐｐｍの遊離カルシウムイオン）が添加される。液化プロセス後、デキストリンはグルコアミラーゼおよび脱分岐酵素（例えばイソアミラーゼもしくはプルラナーゼ）の添加によってデキストロースへ転換させられる。この工程の前に高温（９５℃より高い）を維持しながらｐＨは４．５未満の数値に低下させられ、液化中のアミラーゼ活性は変性させられる。温度は６０℃へ低下させられ、グルコアミラーゼおよび脱分岐酵素が添加される。糖化プロセスは２４～７２時間にわたり進行する。

【０２２９】

（飼料用途）

１つの実施形態では、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、耐性デンプンを分解できる。

【０２３０】

本明細書で使用する用語「分解する工程」は、部分的もしくは完全な、加水分解または耐性デンプンからグルコースおよび／もしくはオリゴ糖（例えばマルトースおよび／またはデキストリン）への分解に関する。

【０２３１】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、動物性アミラーゼによって完全には分解されていない残留耐性デンプンを分解することができる。例えば、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、耐性デンプンの分解を改善する際に動物性アミラーゼ（例、膵アミラーゼ）を補助するために使用できる。膵αアミラーゼは、動物によって消化器系に排出される。膵αアミラーゼは、飼料中のデンプンを分解する。しかし、デンプンの一部分である耐性デンプンは、膵αアミラーゼによって完全には分解されないため、小腸では吸収されない（耐性デンプンの定

義を参照）。一部の実施形態におけるＰＳ４改変体ポリペプチドは、消化器系においてデンプンを分解する際に膵αアミラーゼを支援し、それによって動物によるデンプンの利用を増加させることができる。

【０２３２】

酵素が耐性デンプンを分解する能力は、例えばサンプルの耐性デンプン含有量、可溶化デンプン含有量および全デンプン含有量を測定するためにＭｅｇａｚｙｍｅ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｒｅｌａｎｄ社によって開発され、そして開示された方法（Ｒｅｓｉｓｔａｎｔ　Ｓｔａｒｃｈ　Ａｓｓａｙ　Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅ，ＡＯＡＣ　Ｍｅｔｈｏｄ　２００２．０２，ＡＡＣＣ　Ｍｅｔｈｏｄ　３２－４０）によって分析できる。

【０２３３】

したがって、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、有益な目的で動物によって摂取されるので、従って、動物用飼料中に組み込むことができる。

【０２３４】

このため本発明者らは、デンプンを含有する飼料中に使用するための、または飼料改善剤組成物中に使用するための構成成分としてのＰＳ４改変体ポリペプチドの使用を開示し、ここで、ＰＳ４改変体ポリペプチドは耐性デンプンを分解することができる。本発明者らは、デンプンおよびＰＳ４改変体ポリペプチドを含む飼料をさらに開示する。本発明者らはまた、前記耐性デンプンをＰＳ４改変体ポリペプチドと接触させる工程を包含する、飼料中の耐性デンプンを分解する方法をさらに開示する。

【０２３５】

本発明者らは、耐性デンプンを分解するために、デンプンを含む飼料の調製におけるＰＳ４改変体ポリペプチドの使用についてさらに記載する。さらに、本発明者らは、前記飼料の発熱量を改善するための飼料の調製におけるＰＳ４改変体ポリペプチドの使用を開示する。本発明者らは、動物の能力を改善するための飼料の調製における酵素の使用を開示する。さらなる実施形態では、本発明者らは、デンプンとＰＳ４改変体ポリペプチド酵素とを混合する工程を包含する、飼料を調製するためのプロセスについて記載する。

【０２３６】

例えば、ＰＳ４改変体ポリペプチドを含み、耐性デンプンを分解することができる構成成分の使用は、動物におけるデンプンの分解および／またはデンプン分解産物の顕著な増加が生じるので、有益である。さらに、そのような使用は、動物によるデンプンの消化率および／またはデンプン分解産物の顕著な増加が生じるので、有益である。さらに、そのような使用は、動物による飼料からエネルギーを引き出す効率を強化する手段を提供するので、有益である。さらに、そのような使用は、耐性デンプンの生体内利用率を強化するための手段を提供するので、有益である。

【０２３７】

（動物用飼料）

ＰＳ４改変体ポリペプチドを使用するために適切な動物用飼料は、特定の動物群の特異的な必要を満たすように、そして動物が代謝できる形態で必要な炭水化物、脂肪、タンパク質および他の栄養素を提供するように、調製することができる。

【０２３８】

好ましくは、動物用飼料はブタまたは家禽類用の飼料である。

【０２３９】

本明細書で使用する用語「ブタ」は、ブタ、去勢した雄豚または去勢しない雄豚などの非反芻雑食動物に関する。典型的には、ブタ用飼料には、約５０％の炭水化物、約２０％のタンパク質および約５％の脂肪が含まれる。高エネルギーのブタ用飼料の例は、コーンをベースとしており、例えばタンパク質、ミネラル、ビタミンならびにリジンおよびトリプトファンなどのアミノ酸のような飼料用栄養剤としばしば結合される。ブタ用飼料の例は、動物性タンパク質製品、海産物、乳製品、穀物製品、および植物性タンパク質製品を含んでいるが、これらは全部がさらに天然フレーバー剤、人工フレーバー剤、ミクロミネラルおよびマクロミネラル、動物性脂肪、植物性脂肪、ビタミン、保存料または医薬品（

例えば抗生物質）を含んでいる。
【０２４０】
添付の特許請求の範囲を含めて本明細書において「ブタ用飼料」と言及する場合は、そのような言及は「移行用」もしくは「スターター用」飼料（幼いブタを離乳させるために使用する）および「仕上げ用」もしくは「飼育用」飼料（移行期に続いてブタを市場に出すために適切な年齢および／またはサイズへ成長させるために使用する）を含むことが意図されていると理解されたい。
【０２４１】
本明細書で使用する用語「家禽類」は、ニワトリ、ブロイラー、メンドリ、オンドリ、去勢ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、シャモ、若雌鳥もしくはヒヨコなどの鳥類に関する。家禽類用飼料は、タンパク質、エネルギー、ビタミン、ミネラル、ならびに鳥の適正な成長、産卵および健康に必要な他の栄養素をすべて含有しているので「完全」飼料と呼ぶことができる。しかし、家禽類用飼料は、ビタミン、ミネラルまたは例えば抗コクシジウム剤（例えば、モネンシンナトリウム、ラサロシド、アンプロリウム、サリノマイシン、およびスルファキノキサリン）および／または抗生物質（例えば、ペニシリン、バシトラシン、クロルテトラサイクリン、およびオキシテトラサイクリン）などの医薬品をさらに含んでいてよい。
【０２４２】
食肉製造のために飼育される若いニワトリもしくはブロイラー、シチメンチョウおよびアヒルには、産卵のために飼育される若雌鳥とは異なる飼料が与えられる。ブロイラー、アヒルおよびシチメンチョウはより大きな身体を有し、産卵型のニワトリより急速に体重を増加させる。このため、これらのトリ類にはより高いタンパク質およびエネルギーレベルを備える飼料が与えられる。
【０２４３】
添付の特許の範囲を含めて本明細書において「家禽類用飼料」と言及する場合は、そのような言及は「スターター用」飼料（孵化後）、「仕上げ用」、「飼育用」もしくは「育成用」飼料（６～８週齢から畜殺サイズに達するまで）および「産卵ニワトリ用」（産卵中に与えられる）を含むことが意図されていると理解されたい。
【０２４４】
動物用飼料は、例えば食肉製造、産乳、産卵、繁殖およびストレスへの応答に関して動物の栄養的な必要を満たすように調製することができる。さらに、動物用飼料は、肥料の品質を改善するために調製される。
【０２４５】
好ましい態様では、動物用飼料は、豆果、例えばエンドウマメもしくはダイズまたは穀物、例えば小麦、コーン（トウモロコシ）、ライ麦もしくは大麦などの生材料を含有している。適切には、生材料はジャガイモであってもよい。
【０２４６】
（飼料用材料）
ＰＳ４改変体ポリペプチドは、単独でまたは食品成分などの他の成分と組み合わせてのいずれかで、ＰＳ４改変体ポリペプチドの飼料への間接的もしくは直接的適用によって動物が消費するための飼料中に使用できる。
【０２４７】
典型的な食品成分は、動物性もしくは植物性脂肪、天然もしくは合成シーズニング、抗酸化物質、粘度改変剤、精油、および／またはフレーバー、色素および／または着色剤、ビタミン、ミネラル、天然アミノ酸および／または非天然アミノ酸、栄養素、さらなる酵素（遺伝子組換え酵素を含む）、グアーガムもしくはキサンタンガムなどの結合剤、緩衝剤、乳化剤、潤滑剤、アジュバント、懸濁化剤、保存料、コーティング剤または可溶化剤などの任意の１つ以上の添加物を含むことができる。
【０２４８】
適用方法の例には、ＰＳ４改変体ポリペプチドを含む材料中に飼料を被覆する工程、Ｐ

Ｓ４改変体ポリペプチドを飼料と混合することによる直接的適用、ＰＳ４改変体ポリペプチドを食品表面にスプレーする工程、または飼料をＰＳ４改変体ポリペプチドの調製物中に浸漬する工程が含まれるが、それらに限定されない。

【０２４９】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、好ましくはそれを飼料と混合する工程によって、または動物が消費するための飼料粒子にスプレーする工程によって適用される。または、ＰＳ４改変体ポリペプチドは、飼料のエマルジョン中に含まれてもよく、またはインジェクションもしくはタンブリングによって固形生成物の内側に含まれてもよい。

【０２５０】

ＰＳ４改変体ポリペプチドは、飼料を散在させるか、被覆するかそして／または染み込ませるために適用することもできる。他の成分との混合物もまた使用することができ、個別に、同時にまたは連続的に適用され得る。キレート剤、結合剤、乳化剤ならびにミクロミネラルおよびマクロミネラル、アミノ酸、ビタミン、動物性脂肪、植物性脂肪、保存料、フレーバー剤、着色剤などの他の添加物は、同様に、飼料へ同時に（混合物中または個別のいずれかで）適用されてもよく、または連続的に適用されてもよい。

【０２５１】

（ＰＳ４改変体ポリペプチドの量）

使用されるＰＳ４改変体ポリペプチドの最適な量は、処理される飼料および／または飼料とＰＳ４改変体ポリペプチドとを接触させる方法および／または意図されるその使用に依存するであろう。ＰＳ４改変体ポリペプチドの量は、飼料の摂取後および摂取中に耐性デンプンを実質的に分解するために効果的である十分な量でなければならない。

【０２５２】

有益にも、ＰＳ４改変体ポリペプチドは動物が消費するための飼料の摂取後および飼料の摂取中に、飼料のより完全な摂取が得られるまで、すなわち飼料の増加した発熱量値が放出されるまで有効なままである。

【０２５３】

（アミラーゼの組み合わせ）

本発明者らは、ＰＳ４改変体ポリペプチドとアミラーゼ（特にマルトース生成アミラーゼ）との組み合わせを特に開示する。マルトース生成αアミラーゼ（グルカン１，４−α−マルトヒドロラーゼ、Ｅ．Ｃ．３．２．１．１３３）は、アミロースおよびアミロペクチンをα立体配置にあるマルトースへ加水分解することができる。

【０２５４】

バシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属由来のマルトース生成αアミラーゼ（ＥＰ１２０６９３）は、商標Ｎｏｖａｍｙｌ（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ　Ａ／Ｓ，Ｄｅｎｍａｒｋ）の下で市販されており、デンプンの老化を減少させる能力ゆえに硬化防止剤としてベーキング産業において広範囲で使用されている。Ｎｏｖａｍｙｌは、国際特許公開第ＷＯ９１／０４６６９において詳細に記載されている。マルトース生成αアミラーゼであるＮｏｖａｍｙｌは、配列相同性（Ｈｅｎｒｉｓｓａｔ　Ｂ，Ｂａｉｒｏｃｈ　Ａ；Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．，３１６，６９５−６９６（１９９６））およびトランスグリコシル化生成物の形成（Ｃｈｒｉｓｔｏｐｈｅｒｓｅｎ，Ｃ，ら，１９９７，Ｓｔａｒｃｈ，ｖｏｌ．５０，Ｎｏ．１，３９−４５）を含む数種の特性をシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（ＣＧＴａｓｅｓ）と共有している。

【０２５５】

非常に好ましい実施形態では、本発明者らは、Ｎｏｖａｍｙｌまたはその改変体のいずれかと一緒にＰＳ４改変体ポリペプチドを含む組み合わせを開示する。そのような組み合わせは、ベーキングなどの食品製造のために有用である。Ｎｏｖａｍｙｌは、特にＮｏｖａｍｙｌ　１５００ＭＧを含んでいてよい。

【０２５６】

Ｎｏｖａｍｙｌおよびその使用について記載している他の文書には、Ｃｈｒｉｓｔｏｐｈｅｒｓｅｎ，Ｃ，Ｐｅｄｅｒｓｅｎ，Ｓ．，およびＣｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ，Ｔ．，（

１９９３）Ｍｅｔｈｏｄ　ｆｏｒ　ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｍａｌｔｏｓｅ　ａｎ　ａ　ｌｉｍｉｔ　ｄｅｘｔｒｉｎ，ｔｈｅ　ｌｉｍｉｔ　ｄｅｘｔｒｉｎ，ａｎｄ　ｕｓｅ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｌｉｍｉｔ　ｄｅｘｔｒｉｎ．ＤｅｎｍａｒｋおよびＷＯ９５／１０６２７号が含まれる。これは、さらに米国特許第４，５９８，０４８号および第４，６０４，３５５号に記載されている。これらの文書は各々参考として本明細書に援用され、その中に記載された任意のＮｏｖａｍｙｌポリペプチドは、本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドのいずれかと組み合わせて使用できる。

【０２５７】

Ｎｏｖａｍｙｌの改変体、ホモログ、および突然変異体は、それらがαアミラーゼ活性を維持していることを条件に、組み合わせのために使用できる。例えば、その全開示が参考として本明細書中に援用される米国特許第６，１６２，６２８号に開示された任意のＮｏｖａｍｙｌ改変体は、本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドと組み合わせて使用できる。具体的には、米国特許第６，１６２，６２８号に記載された任意のポリペプチド、特に、米国特許第６，１６２，６２８号に記載の配列番号１の改変体であって、Ｑ１３、Ｉ１６、Ｄ１７、Ｎ２６、Ｎ２８、Ｐ２９、Ａ３０、Ｓ３２、Ｙ３３、Ｇ３４、Ｌ３５、Ｋ４０、Ｍ４５、Ｐ７３、Ｖ７４、Ｄ７６、Ｎ７７、Ｄ７９、Ｎ８６、Ｒ９５、Ｎ９９、Ｉ１００、Ｈ１０３、Ｑ１１９、Ｎ１２０、Ｎ１３１、Ｓ１４１、Ｔ１４２、Ａ１４８、Ｎ１５２、Ａ１６３、Ｈ１６９、Ｎ１７１、Ｇ１７２、Ｉ１７４、Ｎ１７６、Ｎ１８７、Ｆ１８８、Ａ１９２、Ｑ２０１、Ｎ２０３、Ｈ２２０、Ｎ２３４、Ｇ２３６、Ｑ２４７、Ｋ２４９、Ｄ２６１、Ｎ２６６、Ｌ２６８、Ｒ２７２、Ｎ２７５、Ｎ２７６、Ｖ２７９、Ｎ２８０、Ｖ２８１、Ｄ２８５、Ｎ２８７、Ｆ２９７、Ｑ２９９、Ｎ３０５、Ｋ３１６、Ｎ３２０、Ｌ３２１、Ｎ３２７、Ａ３４１、Ｎ３４２、Ａ３４８、Ｑ３６５、Ｎ３７１、Ｎ３７５、Ｍ３７８、Ｇ３９７、Ａ３８１、Ｆ３８９、Ｎ４０１、Ａ４０３、Ｋ４２５、Ｎ４３６、Ｓ４４２、Ｎ４５４、Ｎ４６８、Ｎ４７４、Ｓ４７９、Ａ４８３、Ａ４８６、Ｖ４８７、Ｓ４９３、Ｔ４９４、Ｓ４９５、Ａ４９６、Ｓ４９７、Ａ４９８、Ｑ５００、Ｎ５０７、Ｉ５１０、Ｎ５１３、Ｋ５２０、Ｑ５２６、Ａ５５５、Ａ５６４、Ｓ５７３、Ｎ５７５、Ｑ５８１、Ｓ５８３、Ｆ５８６、Ｋ５８９、Ｎ５９５、Ｇ６１８、Ｎ６２１、Ｑ６２４、Ａ６２９、Ｆ６３６、Ｋ６４５、Ｎ６６４および／またはＴ６８１に対応する任意の１つ以上の位置における改変体を、使用できる。

【０２５８】

（アミノ酸配列）

本発明は、ＰＳ４改変体核酸を利用するが、そのようなＰＳ４改変体核酸のアミノ酸配列は本明細書に記載した方法および組成物に含まれる。

【０２５９】

本明細書で使用する用語「アミノ酸配列」は、用語「ポリペプチド」および／または用語「タンパク質」と同義語である。一部の場合には、用語「アミノ酸配列」は用語「ペプチド」と同義語である。一部の場合には、用語「アミノ酸配列」は用語「酵素」と同義語である。

【０２６０】

アミノ酸配列は適切な起源から調製／単離することができ、または合成により作製でき、または組換えＤＮＡ技術を使用して調製できる。

【０２６１】

本明細書に記載したＰＳ４改変体酵素は、他の酵素と結び付けて使用できる。従って本発明者らは、酵素の組み合わせであって、ここで、この組み合わせは本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリペプチドおよび他の酵素（それ自体が別のＰＳ４改変体ポリペプチド酵素であってもよい）を含んでいる組み合わせを、開示する。

【０２６２】

（ＰＳ４改変体のヌクレオチド配列）

上述したように、本発明者らは、本明細書に記載した特異的な特性を有するＰＳ４改変体酵素をコードするヌクレオチド配列を開示する。

【０２６３】
本明細書で使用する用語「ヌクレオチド配列」または「核酸配列」は、オリゴヌクレオチド配列もしくはポリヌクレオチド配列、およびそれらの改変体、ホモログ、フラグメントおよび誘導体（それらの部分など）を意味する。ヌクレオチド配列は、ゲノム起源もしくは合成起源または組換え起源であってもよく、センス鎖もしくはアンチセンス鎖のいずれを表していようと、二本鎖であっても、もしくは一本鎖であってもよい。
【０２６４】
本明細書で使用する用語「ヌクレオチド配列」には、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、合成ＤＮＡ、およびＲＮＡが含まれる。好ましくは、これはＰＳ４改変体ポリペプチドをコードするＤＮＡ、より好ましくはｃＤＮＡ配列を意味する。
【０２６５】
典型的には、ＰＳ４改変体ヌクレオチド配列は、組換えＤＮＡ技術を用いて調製される（すなわち、組換えＤＮＡである）。しかし、さらなる実施形態では、ヌクレオチド配列は、全体としてもしくは部分的に、当技術分野において周知の化学方法を用いて合成することもできよう（例えば、Ｃａｒｕｔｈｅｒｓ　ＭＨら，（１９８０）Ｎｕｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　Ｓｙｍｐ　Ｓｅｒ　２１５－２３　ａｎｄ　Ｈｏｒｎ　Ｔら，（１９８０）Ｎｕｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　Ｓｙｍｐ　Ｓｅｒ　２２５－２３２を参照）。
【０２６６】
（核酸配列の調製）
本明細書に記載した特定の特性を有する酵素（例、ＰＳ４改変体ポリペプチド）または親酵素などの改変のために適切な酵素のいずれかをコードするヌクレオチド配列は、前記酵素を産生する任意の細胞もしくは生物から同定および／または単離および／または精製することができる。ヌクレオチド配列を同定および／または単離および／または精製するための様々な方法は、当技術分野において周知である。例えば、適切な配列が同定および／または単離および／または精製されると、ＰＣＲ増幅技術を使用して、より多くの配列を調製することができる。
【０２６７】
さらなる例として、該酵素を産生する生物由来の染色体ＤＮＡ、またはメッセンジャーＲＮＡを用いるとゲノムＤＮＡおよび／またはｃＤＮＡライブラリーを構築できる。該酵素のアミノ酸配列もしくは該酵素のアミノ酸配列の一部が既知である場合、標識オリゴヌクレオチドプローブを合成し、これを使用して、該生物から調製したゲノムライブラリーから酵素をコードするクローンを同定することができる。または、他の既知の酵素遺伝子に相同である配列を含有する標識オリゴヌクレオチドプローブを使用して、酵素をコードするクローンを同定できる。後者の場合は、ハイブリダイゼーションおよび低ストリンジェントな洗浄条件が使用される。
【０２６８】
または、酵素をコードするクローンは、酵素陰性細菌を形質転換させるプラスミドなどの発現ベクター内へゲノムＤＮＡのフラグメントを挿入してゲノムＤＮＡライブラリーを得、そして次に形質転換させた細菌を、酵素に対する基質（すなわち、マルトース）を含有する寒天プレート上に平板培養し、それによってクローンに同定すべき酵素を発現させることによって同定できる。
【０２６９】
なおさらなる代替において、該酵素をコードするヌクレオチド配列は、例えばＢｅｕｃａｇｅ　ＳＸ．ら，（１９８１）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　２２，ｐ　１８５９－１８６９によって記載されたホスホロアミダイト法、またはＭａｔｔｈｅｓら，（１９８４）ＥＭＢＯ　Ｊ．３，ｐ．８０１－８０５によって記載された方法のような確立された標準方法によって合成的に調製できる。ホスホロアミダイト法では、オリゴヌクレオチドが例えば自動ＤＮＡ合成装置内で合成され、精製され、アニールされ、ライゲーションされ、そして適切なベクター内にクローン化される。
【０２７０】

ヌクレオチド配列は、標準技術にしたがい、（適切な場合）ゲノム起源もしくはｃＤＮＡ起源のフラグメントをライゲーションすることによって調製された、ゲノム起源および合成起源の混合物、合成起源およびｃＤＮＡ起源の混合物、またはゲノム起源およびｃＤＮＡ起源の混合物であり得る。ライゲーションされたフラグメントは各々、全ヌクレオチド配列の様々な部分に対応する。ＤＮＡ配列は、例えば米国特許第４，６８３，２０２号またはＳａｉｋｉ　Ｒ　Ｋら，（Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８）２３９，ｐｐ　４８７－４９１）に記載されたように、特異的プライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって調製することもできる。

【０２７１】

（改変体／ホモログ／誘導体）

本発明者らは、酵素の任意のアミノ酸配列の改変体、ホモログおよび誘導体または例えばＰＳ４改変体ポリペプチドもしくはＰＳ４改変体核酸などの酵素をコードする任意のヌクレオチド配列の使用についてさらに記載する。文脈が他のことを指示しない限り、用語「ＰＳ４改変体核酸」は、以下に記載する核酸実体の各々を含むと見なさなければならず、そして用語「ＰＳ４改変体ポリペプチド」は、同様に以下に記載するポリペプチドもしくはアミノ酸実体の各々を含むと見なさなければならない。

【０２７２】

ここで、用語「ホモログ」は、本発明のアミノ酸配列および本発明のヌクレオチド配列と所定の相同性を有する実体を意味する。ここで用語「相同性」は、「同一性」と同等と考えることができる。

【０２７３】

本明細書の文脈では、相同配列は、本発明の配列と少なくとも７５、８０、８５または９０％同一、好ましくは少なくとも９５、９６、９７、９８または９９％同一であり得るアミノ酸配列を含むと見なされる。典型的には、ホモログは本発明のアミノ酸配列と同一活性部位などを含む。相同性は類似性（すなわち、類似の化学的特性／機能を有するアミノ酸残基）によって考察することもできるが、本明細書の文脈においては相同性は配列同一性によって明示するのが好ましい。

【０２７４】

本明細書の文脈では、相同配列は、ＰＳ４改変体ポリペプチド酵素をコードするヌクレオチド配列（ＰＳ４改変体核酸など）と少なくとも７５、８０、８５または９０％同一、好ましくは少なくとも９５、９６、９７、９８または９９％同一である可能性のあるヌクレオチド配列を含むと見なされる。典型的には、ホモログは本発明の配列と同一活性部位などをコードする配列を含む。相同性は類似性（すなわち、類似の化学的特性／機能を有するアミノ酸残基）によって考察することもできるが、本明細書の文脈においては相同性は配列同一性によって明示するのが好ましい。

【０２７５】

相同性の比較は、目で見て実施可能であり、より一般的には容易に入手できる配列比較プログラムを用いて実施できる。これらの市販で入手できるコンピュータープログラムは、２つ以上の配列間の相同性（％）を計算できる。

【０２７６】

相同性（％）は、連続する配列にわたって計算できる。すなわち１つの配列が他の配列と並列させられ、１つの配列内の各アミノ酸は他の配列内の対応するアミノ酸と直接的に、１度に１残基ずつ比較される。これは「ギャップを入れない（ｕｎｇａｐｐｅｄ）」アラインメントと呼ばれる。典型的には、そのようなギャップを入れないアラインメントは、比較的少数の残基についてのみ実施される。

【０２７７】

これは極めて単純かつ一貫性のある方法ではあるが、例えば他の点では同一である一対の配列において、１つの挿入もしくは欠失によりその後のアミノ酸残基がアラインメントから追い出されることを考慮に入れることができないので、したがって全体的アラインメントが実施される場合は相同性（％）の大きな低下が生じる可能性がある。結果として、

大多数の配列比較方法は、過度に全相同性スコアにペナルティを課すことなく可能性のある挿入および欠失を考慮に入れた最適のアラインメントを生じさせるように設計されている。これは、ローカル相同性を最大化することを試みるために配列アラインメントにおいて「ギャップ」を挿入することによって達成される。

【０２７８】

しかし、これらのより複雑な方法は「ギャップペナルティ」をアラインメントにおいて生じる各ギャップに指定するので、その結果同一数の同一アミノ酸について、最小限のギャップを備える配列アラインメントは、多くのギャップを備える配列アラインメントより（２つの比較対象の配列間でのより高度の関連性を反映して）高いスコアを達成するであろう。典型的にはギャップの存在について比較的高いコストを課し、ギャップ内のその後の各残基に対しては小さなペナルティを課す「アフィンギャップコスト」が使用される。これは、最も一般的に使用されるギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティは、当然ながらより少数のギャップを備える最適化されたアラインメントを生じさせるであろう。大多数のアラインメントプログラムは、ギャップペナルティの改変を許容する。しかし、配列比較のためにそのようなソフトウエアを使用する場合は、デフォルト値を使用するのが好ましい。例えば、ＧＣＧ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージを使用する場合は、アミノ酸配列に対するデフォルトのギャップペナルティは、１つのギャップに対しては－１２、各伸長に対しては－４である。

【０２７９】

このため最大相同性（％）の計算には、最初に、ギャップペナルティを考慮に入れた、最適なアラインメントを必要とする。そのようなアラインメントを実行するために適切なコンピュータープログラムは、ＧＣＧ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘ　ｅｔ　ａｌ，１９８４，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　１２　ｐ．３８７）である。配列比較を実行できる他のソフトウエアの例には、ＢＬＡＳＴパッケージ（Ａｕｓｕｂｅｌら，１９９９　Ｓｈｏｒｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，４^{ｔｈ}　Ｅｄ　－　Ｃｈａｐｔｅｒ　１８を参照）、ＦＡＳＴＡ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら，１９９０，Ｊ．ＭｏＩ．Ｂｉｏｌ．，４０３－４１０）および比較ツールのＧＥＮＥＷＯＲＫＳパッケージソフトが含まれるが、それらに限定されない。ＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡはどちらもオフラインおよびオンライン検索のために利用できる（Ａｕｓｕｂｅｌら，１９９９，Ｓｈｏｒｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｐａｇｅｓ．７－５８ｔｏ７－６０を参照）。

【０２８０】

しかし、一部の用途には、ＧＣＧ　Ｂｅｓｔｆｉｔプログラムを使用するのが好ましい。ＢＬＡＳＴ　２配列と呼ばれる新規のツールもまたタンパク質とヌクレオチド配列を比較するために利用できる（ＦＥＭＳ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　Ｌｅｔｔ　１９９９　１７４（２）：２４７－５０；ＦＥＭＳ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　Ｌｅｔｔ　１９９９　１７７（１）：１８７－８およびｔａｔｉａｎａ＠ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖを参照）。

【０２８１】

最終的な相同性（％）は同一性によって測定できるが、アラインメントプロセス自体は、典型的には全か無かのペア比較に基づいてはいない。その代わりに、化学的類似性または進化的な距離に基づいて各一対の比較に対してスコアを指定する縮尺類似性スコアマトリックス（ｓｃａｌｅｄ　ｓｉｍｉｌａｒｉｔｙ　ｓｃｏｒｅ　ｍａｔｒｉｘ）が一般に使用されている。そのような一般に使用されるマトリックスの例は、プログラムのＢＬＡＳＴパッケージソフトのためのデフォルトマトリックスであるＢＬＯＳＵＭ６２マトリックスである。ＧＣＧ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎプログラムは、一般に公衆デフォルト値または（供給される場合）カスタム記号比較表（詳細についてはユーザーマニュアルを参照）のどちらかを使用する。一部の用途のためには、ＧＣＧパッケージ用の公衆デフォルト値、または他のソフトウエアの場合は、ＢＬＯＳＵＭ　６２などのデフォルトマトリックスを使用するのが好ましい。

【０２８２】
または、相同性（％）は、ＣＬＵＳＴＡＬ（Ｈｉｇｇｉｎｓ ＤＧ ＆ Ｓｈａｒｐ ＰＭ（１９８８），Ｇｅｎｅ ７３（１），２３７－２４４）に類似するアルゴリズムに基づいてＤＮＡＳＩＳ（商標）（Ｈｉｔａｃｈｉ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）における多重アラインメント機能を使用して計算できる。

【０２８３】
ソフトウエアが最適アラインメントを生成すると、相同性（％）、好ましくは配列同一性（％）を計算することができる。このソフトウエアは、典型的にはこれを配列比較の一部として行ない、数値結果を生成する。

【０２８４】
配列は、サイレント変化を生じ、結果として機能的に同等の配列を生じさせるアミノ酸の欠失、挿入または置換を有することもある。意図的アミノ酸置換は、アミノ酸特性（残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および／または両親媒性の性質など）における類似性に基づいて作製することができるので、このため官能基内においてアミノ酸をまとめて分類することが有用である。アミノ酸は、それらの側鎖特性にのみ基づいてまとめて分類することができる。しかし、突然変異データをもまた含めることがより有用である。このように誘導されたアミノ酸のセットは、おそらく構造的理由から保存される可能性が高い。これらのセットは、ベン図の形で記載することができる（Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ ＣＤ．ａｎｄ Ｂａｒｔｏｎ ＧＪ．（１９９３）“Ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｌｉｇｎｍｅｎｔｓ：ａ ｓｔｒａｔｅｇｙ ｆｏｒ ｔｈｅ ｈｉｅｒａｒｃｈｉｃａｌ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｒｅｓｉｄｕｅ ｃｏｎｓｅｒｖａｔｉｏｎ” Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ Ｂｉｏｓｃｉ．９：７４５－７５６）（Ｔａｙｌｏｒ Ｗ．Ｒ．（１９８６）“Ｔｈｅ ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｃｏｎｓｅｒｖａｔｉｏｎ” Ｊ．Ｔｈｅｏｒ．Ｂｉｏｌ．１１９；２０５－２１８）。保存的置換は、例えば、一般に容認されたアミノ酸のベン図分類について記載している以下の表にしたがって作製できる。

【０２８５】
【化６】

セット		サブセット	
疎水性	FWYHKMILVAGC	芳香族	FWYH
		脂肪族	ILV
極性	WYHKREDCSTNQ	荷電	HKRED
		正に荷電	HKR
		負に荷電	ED
小	VCAGSPTND	極小	AGS

本発明者らは、塩基性対塩基性、酸性対酸性、極性対極性などの同類置換を生じ得る相同置換（置換および交換はどちらも本明細書では先在アミノ酸残基と代替残基との交換を意味するために使用される）を含む配列をさらに開示する。非相同置換は、１クラスの残基から別のクラスの残基へ生じ得るか、または代わりにオルニチン（本明細書中以下ではＺと呼ぶ）、ジアミノ酪酸オルニチン（本明細書中以下以下ではＢと呼ぶ）、ノルロイシンオルニチン（本明細書中以下以下ではＯと呼ぶ）、ピリルアラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニンおよびフェニルグリシンなどの非天然アミノ酸を含むことによって生

じ得る。

【０２８６】

改変体アミノ酸配列は、配列の任意の２つのアミノ酸残基間に挿入できる、グリシンもしくはβアラニン残基などのアミノ酸スペーサーに加えてメチル基、エチル基もしくはプロピル基などのアルキル基を含む適切なスペーサー基を含むことができる。さらなるバリエーションの形態は、ペプトイド形態中に１つ以上のアミノ酸残基の存在を含むことが、当業者には明確に理解されるであろう。疑念を回避するために、「ペプトイド形態」は、改変体アミノ酸残基を呼ぶために使用されるが、ここで、α炭素置換基は残基のα炭素ではなく窒素原子上に存在する。ペプトイド形態にあるペプチドを調製するためのプロセスは、例えばＳｉｍｏｎ　ＲＪら，ＰＮＡＳ（１９９２）８９（２０），９３６７－９３７１およびＨｏｒｗｅｌｌ　ＤＣ，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ（１９９５）１３（４），１３２－１３４のように、当技術分野において公知である。

【０２８７】

本明細書に記載したヌクレオチド配列、および本明細書に記載した方法および組成物（ＰＳ４改変体核酸など）において使用するために適切なヌクレオチド配列は、それらの中に合成ヌクレオチドもしくは改変ヌクレオチドを含んでいてよい。オリゴヌクレオチドに対する多数の様々な型の改変は、当技術分野において公知である。これらには、メチルホスホネート主鎖およびホスホロチオエート主鎖、ならびに／もしくは分子の３’末端および／または５’末端でのアクリジンもしくはポリリジン鎖の付加が含まれる。本明細書のために、本明細書に記載したヌクレオチド配列は、当技術分野において利用可能な任意の方法によって改変できることを理解されたい。そのような改変は、ヌクレオチド配列のインビボ活性を増強するかまたは寿命を延長させるために実行することができる。

【０２８８】

本発明者らは、本明細書に提示した配列に相補的であるヌクレオチド配列、もしくは任意の誘導体、フラグメントまたはそれらの誘導体の使用についてさらに記載する。配列がそのフラグメントに相補的である場合は、その配列は他の生物における類似のコード配列を同定するなどのためにプローブとして使用できる。

【０２８９】

ＰＳ４改変体配列に１００％相同ではないポリヌクレオチドは、多数の方法で得られ得る。本明細書に記載した配列の他の改変体は、例えば広範囲の個体（例えば様々な集団由来の個体）から作製されたＤＮＡライブラリーをプローブ検査（ｐｒｏｂｉｎｇ）することによって得られ得る。さらに、他のホモログが得られ得、そのようなホモログおよびそのフラグメントは一般に本明細書の配列表に示した配列へ選択的にハイブリダイズすることができるであろう。そのような配列は、中ストリンジェントから高ストリンジェントな条件下で添付の配列表に記載の任意の１つの配列の全部または一部を含むプローブを用いて、他の種から作製されたｃＤＮＡライブラリー、または他の種由来のゲノムＤＮＡライブラリーをプローブ検査するか、そのようなライブラリーを精査することによって得られ得る。本明細書に記載したポリペプチド配列またはヌクレオチド配列の種のホモログおよび対立遺伝子改変体を得るためにも、類似の考察が当てはまる。

【０２９０】

改変体および菌株／種のホモログは、また、保存されたアミノ酸配列をコードする改変体およびホモログ内の配列を標的とするように設計されたプライマーを使用する縮重ＰＣＲを用いて得ることもできる。保存配列は、例えば数種の改変体／ホモログ由来のアミノ酸配列を並列することによって予測できる。配列アラインメントは、当技術分野において公知であるコンピューターソフトウエアを用いて実施できる。例えば、ＧＣＧ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　ＰｉｌｅＵｐプログラムが広汎に使用されている。

【０２９１】

縮重ＰＣＲに使用されるプライマーは１つ以上の縮重位置を含有しており、既知の配列に対して単一の配列プライマーを用いて配列をクローニングするために使用される条件よりも低いストリンジェントの条件で使用されるであろう。

【０２９２】
　または、そのようなポリヌクレオチドは、性質決定された配列の部位特異的突然変異誘発によって得ることができる。これは、例えばポリヌクレオチド配列が発現させられる特定の宿主細胞に対するコドン選択性を最適化するためにサイレントなコドン配列変化が必要とされる場合に有用なことがある。制限酵素認識部位を導入するため、またはポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドの特性もしくは機能を変化させるために、他の配列変化が望ましいことがある。
【０２９３】
　本明細書に記載したＰＳ４改変体核酸などのポリヌクレオチド（ヌクレオチド配列）は、プライマー（例えばＰＣＲプライマー、代替増幅反応のためのプライマー）、プローブ（例えば放射性標識もしくは非放射性標識を用いる従来型手段によって解明できる標識で標識したプローブ）、またはベクター内へクローン化することができるポリヌクレオチドを生成するために使用できる。そのようなプライマー、プローブおよび他のフラグメントは、少なくとも１５、好ましくは少なくとも２０、例えば少なくとも２５、３０もしくは４０のヌクレオチド長であり、やはり用語ポリヌクレオチドに含まれる。
【０２９４】
　ＤＮＡポリヌクレオチドおよびプローブなどのポリヌクレオチドは、組換えによって、合成によって、または当業者が利用できる任意の手段によって生成できる。それらは、標準技術によってクローン化することもできる。一般に、プライマーは、１度に１ヌクレオチドという所望の核酸配列の段階的製造を包含する合成手段によって生成される。自動技術を用いてこれを遂行する技術は、当技術分野において容易に利用できる。
【０２９５】
　長いポリヌクレオチドは、一般に、組換え手段（例えばＰＣＲ（ポリメラーゼ連鎖反応）クローニング技術を用いる）を用いて生成される。プライマーは、増幅したＤＮＡを適切なクローニングベクター内へクローン化できるように適切な制限酵素認識部位を含有するように設計できる。好ましくは、改変体配列などは、少なくとも本明細書に提示した配列と同等に、生物学的に活性である。
【０２９６】
　本明細書で使用する「生物学的に活性」は、天然に存在する配列の類似の構造機能（必ずしも同程度ではない）、および／または類似の調節機能（必ずしも同程度ではない）、および／または類似の生化学的機能（必ずしも同程度ではない）を有する配列をいう。
【０２９７】
　（ハイブリダイゼーション）
　本発明者らは、ＰＳ４改変体の核酸配列に相補的である配列またはＰＳ４改変体配列もしくはそれに相補的である配列のいずれかへハイブリダイズすることができる配列についてさらに記載する。
【０２９８】
　本明細書で使用する用語「ハイブリダイゼーション」は、「核酸の鎖が塩基対合を通して相補的鎖と結合するプロセス」ならびにポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）テクノロジーにおいて実施されるような増幅プロセスを含むものとする。このため本発明者らは、本明細書に提示した配列に相補的である配列にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列、または任意の誘導体、フラグメントもしくはそれらの誘導体の使用について開示する。
【０２９９】
　用語「改変体」は、本明細書に明示したヌクレオチド配列へハイブリダイズすることができる配列に相補的である配列をさらに含んでいる。
【０３００】
　好ましくは用語「改変体」は、ストリンジェントな条件（例えば、５０℃および０．２×ＳＳＣ｛１×ＳＳＣ＝０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０１５Ｍクエン酸三ナトリウム（ｐＨ７．０）｝）下で本明細書に提示したヌクレオチド配列へハイブリダイズすることがで

きる配列に相補的である配列を含んでいる。より好ましくは、用語「改変体」は、高ストリンジェント条件（例えば、６５℃および０．１×ＳＳＣ｛１×ＳＳＣ＝０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０１５Ｍクエン酸三ナトリウム（ｐＨ７．０）｝）下で本明細書に提示したヌクレオチド配列へハイブリダイズすることができる配列に相補的である配列を含んでいる。

【０３０１】

本発明者らは、ＰＳ４改変体のヌクレオチド配列（本明細書に提示した配列に相補的な配列を含む）にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列、ならびにＰＳ４改変体のヌクレオチド配列（本明細書に提示した配列に相補的な配列を含む）にハイブリダイズすることができる配列に相補的であるヌクレオチド配列をさらに開示する。本発明者らは、中間から最高までのストリンジェントの条件下で本明細書に提示したヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチド配列についてさらに記載する。

【０３０２】

好ましい態様では、本発明者らは、ストリンジェントな条件（例えば、５０℃および０．２×ＳＳＣ）下でＰＳ４改変体核酸のヌクレオチド配列またはそれらの相補体にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を開示する。より好ましくは、このヌクレオチド配列は、高ストリンジェントな条件（例えば、６５℃および０．１×ＳＳＣ）下でＰＳ４改変体のヌクレオチド配列またはそれらの相補体にハイブリダイズすることができる。

【０３０３】

（部位特異的突然変異誘発）

酵素をコードするヌクレオチド配列か、または酵素をコードすると推定されるヌクレオチド配列が単離されると、酵素を調製するためにその配列を突然変異させることが所望され得る。したがって、ＰＳ４改変体配列は、親配列から調製できる。突然変異は合成オリゴヌクレオチドを用いて導入できる。これらのオリゴヌクレオチドは、所望の突然変異部位に隣接するヌクレオチド配列を含有している。

【０３０４】

適切な方法は、Ｍｏｒｉｎａｇａら，（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１９８４）２，ｐ６４６－６４９）の中で開示されている。酵素をコードするヌクレオチド配列内へ突然変異を導入するさらなる方法は、Ｎｅｌｓｏｎ ａｎｄ Ｌｏｎｇ（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（１９８９），１８０，ｐ１４７－１５１）に記載されている。さらなる方法は、Ｓａｒｋａｒ ａｎｄ Ｓｏｍｍｅｒ（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（１９９０），８，ｐ４０４－４０７－“Ｔｈｅ ｍｅｇａｐｒｉｍｅｒ ｍｅｔｈｏｄ ｏｆ ｓｉｔｅ ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ”）の中に記載されている。

【０３０５】

１つの態様では、本明細書に記載した方法および組成物において使用するための配列は、組換え配列（すなわち、組換えＤＮＡ技術を用いて調製されている配列）である。これらの組換えＤＮＡ技術は、当業者の能力の範囲内に含まれる。そのような技術は、例えばＪ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｅ．Ｆ．Ｆｒｉｔｓｃｈ，ａｎｄ Ｔ．Ｍａｎｉａｔｉｓ，１９８９，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第２版，Ｂｏｏｋｓ １－３，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓのような文献において説明されている。

【０３０６】

１つの態様では、本明細書に記載した方法および組成物において使用するための配列は、合成配列（すなわち、インビトロ化学合成または酵素合成によって調製されている配列）である。これは、メチロトローフ酵母であるピチア（Ｐｉｃｈｉａ）属およびハンセヌラ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）属などの宿主生物のために最適なコドン使用（ｃｏｄｏｎ ｕｓａｇｅ）により作製された配列を含むが、それらに限定されない。

【０３０７】

本明細書に記載した方法および組成物において使用するためのヌクレオチド配列は、組換え複製可能なベクター内に組み込むことができる。ベクターは、適切な宿主細胞中で、および／または宿主細胞から、酵素の形態でヌクレオチド配列を複製して発現させるために使用できる。発現は、制御配列（例えば調節配列）を用いて制御することができる。ヌクレオチド配列の発現によって宿主組換え細胞から生成された酵素は、使用された配列および／またはベクターに依存して分泌されてもよく、または細胞内に含有されていてもよい。特定の原核生物細胞膜もしくは真核生物細胞膜を通してコード配列に物質の分泌を指示するシグナル配列を備えるコード配列を、設計できる。

【０３０８】

（ＰＳ４核酸およびポリペプチドの発現）

ＰＳ４ポリヌクレオチドおよびＰＳ４核酸は、合成および天然両方の起源のＤＮＡおよびＲＮＡを含んでいてよい。そのＤＮＡもしくはＲＮＡは、改変もしくは未改変のデオキシヌクレオチドもしくはジデオキシヌクレオチドまたはリボヌクレオチドあるいはそれらのアナログを含有し得る。ＰＳ４核酸は一本鎖もしくは二本鎖ＤＮＡもしくはＲＮＡ、ＲＮＡ／ＤＮＡヘテロ二本鎖またはＲＮＡ／ＤＮＡコポリマーとして存在することができ、ここで、用語「コポリマー」は、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドの両方を含む単一核酸鎖を意味する。ＰＳ４核酸は、いっそう発現を増加させるように最適化されたコドンでさえあってもよい。

【０３０９】

本明細書で使用する用語「合成」は、インビトロ化学合成または酵素合成によって生成することであると定義されている。これは、メチロトローフ酵母であるピチア属およびハンセヌラ属などの宿主生物のために最適なコドン使用により作製されたＰＳ４核酸を含むが、それらに限定されない。

【０３１０】

ポリヌクレオチド（例えば本明細書に記載したＰＳ４改変体ポリヌクレオチド）は、組換え複製可能なベクター内に組み込むことができる。ベクターを使用して、適合する宿主細胞内でこの核酸を複製することができる。このポリヌクレオチド配列を含むベクターは、適切な宿主細胞、形質転換させることができる。適切な宿主は、細菌、酵母、昆虫および真菌細胞を含むことができる。

【０３１１】

用語「形質転換細胞」は、組換えＤＮＡ技術を使用して形質転換させられている細胞を含んでいる。形質転換は、典型的には１つ以上のヌクレオチド配列を形質転換させるべき細胞内へ挿入することによって起こる。挿入されたヌクレオチド配列は、異種ヌクレオチド配列（すなわち形質転換させるべき細胞にとって自然ではない配列）であってもよい。さらに、あるいはその代わりに、挿入されたヌクレオチド配列は、相同ヌクレオチド配列（すなわち、形質転換させるべき細胞にとって自然である配列）であってもよく、それにより、その細胞は既にその中に存在するヌクレオチド配列の１つ以上の余分なコピーを受け入れる。

【０３１２】

従ってさらなる実施形態では、本発明者らは、ポリヌクレオチドを複製可能なベクター内へ導入する工程と、そのベクターを適切な宿主細胞内へ導入する工程と、およびベクターの複製が起こる条件下で宿主細胞を増殖させる工程とによってＰＳ４改変体ポリペプチドおよびポリヌクレオチドを作製する方法を提供する。ベクターは、宿主細胞から回収できる。

【０３１３】

（発現構築物）

ＰＳ４核酸は、当該宿主細胞内で活性な転写調節エレメントおよび翻訳調節エレメントへ作動可能に連結させることができる。ＰＳ４核酸は、さらに例えばＳｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ　ｏｃｃｉｄｅｎｔａｌｉｓ由来のグルコアミラーゼ遺伝子、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ由来のα因子接合型遺伝子およびＡｓｐｅｒｇｉｌ

ｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅ由来のＴＡＫＡ－アミラーゼに由来するシグナル配列などのシグナル配列を含む融合タンパク質をさらにコードできる。または、ＰＳ４核酸は、膜結合ドメインを含む融合タンパク質をコードすることができる。

【０３１４】

（発現ベクター）

ＰＳ４核酸は、発現ベクターを用いて宿主生物において所望のレベルで発現させることができる。

【０３１５】

ＰＳ４核酸を含む発現ベクターは、選択された宿主細胞内でＰＳ４核酸をコードする遺伝子を発現できる任意のベクターであってよく、ベクターの選択は、それを導入すべき宿主細胞に依存する。従って、ベクターは自律複製ベクター（すなわちエピソーム実体として存在するベクター）であってよく、その複製は、例えばプラスミド、バクテリオファージもしくはエピソームエレメント、ミニ染色体もしくは人工染色体などの染色体複製とは無関係である。または、ベクターは、宿主細胞内へ導入されると宿主細胞ゲノム内に統合され、染色体と一緒に複製されるベクターであってもよい。

【０３１６】

（発現ベクターの構成成分）

発現ベクターは、典型的には、例えば選択された宿主生物内でのベクターの自律複製を許容するエレメント、および選択目的のための１つ以上の表現型によって検出可能なマーカーなどのクローニングベクターの構成成分を含んでいる。発現ベクターは、通常はプロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位、翻訳開始シグナル、ならびに必要に応じて、リプレッサー遺伝子または１つ以上のアクチベーター遺伝子をコードする制御ヌクレオチド配列を含んでいる。さらに、発現ベクターは、ペルオキシソームなどの宿主細胞オルガネラまたは特定宿主細胞区画へＰＳ４改変体ポリペプチドを標的化できるアミノ酸配列をコードする配列を含んでいてよい。そのような標的化配列としては、配列ＳＫＬが挙げられるが、それに限定されない。本明細書の文脈では、用語「発現シグナル」は、上記の制御配列、リプレッサー配列もしくはアクチベーター配列のいずれかを含んでいる。制御配列の指示下で発現させるために、ＰＳ４改変体ポリペプチドの核酸配列は発現に関して適正な方法で制御配列と作動可能に連結している。

【０３１７】

好ましくは、ベクター内のポリヌクレオチドは、宿主細胞によるコード配列の発現を提供できる制御配列に作動可能に連結している。すなわちベクターは発現ベクターである。用語「作動可能に連結した」は、記載の構成成分が意図された様式で機能することを許容する関係にあることを意味している。コード配列に「作動可能に連結した」調節配列は、コード配列の発現が制御配列と適合した条件下で達成されるような方法でライゲーションされる。

【０３１８】

制御配列は、例えば転写調節因子により反応性である制御配列によって指示された転写レベルを作り出すためにさらなる転写調節エレメントの付加によって改変することができる。制御配列は、特に、プロモーターを含んでいてよい。

【０３１９】

（プロモーター）

ベクター内では、ＰＳ４改変体ポリペプチドをコードする核酸配列は適切なプロモーター配列と作動可能に結合している。プロモーターは、選択された宿主生物内で転写活性を有する任意のＤＮＡ配列であってよく、そして宿主生物に同種または異種である遺伝子から誘導することができる。

【０３２０】

（細菌プロモーター）

細菌宿主内でＰＳ４核酸などの改変ヌクレオチド配列の転写を指示するために適切なプロモーターの例としては、Ｅ．ｃｏｌｉのｌａｃオペロンのプロモーター、Ｓｔｒｅｐｔ

ｏｍｙｃｅｓ　ｃｏｅｌｉｃｏｌｏｒアガラーゼ（ａｇａｒａｓｅ）遺伝子ｄａｇＡプロモーター、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓαアミラーゼ遺伝子（ａｍｙＬ）のプロモーター、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓマルトース生成アミラーゼ遺伝子（ａｍｙＭ）のプロモーター、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓαアミラーゼ遺伝子（ａｍｙＱ）のプロモーター、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓのｘｙｌＡおよびｘｙｌＢ遺伝子のプロモーターならびにＰ１７０プロモーターを含むラクトコッカス種（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．）由来のプロモーターが挙げられる。ＰＳ４改変体ポリペプチドをコードする遺伝子がＥ．ｃｏｌｉなどの細菌種中で発現させられる場合は、適切なプロモーターは、例えばＴ７プロモーターおよびファージλプロモーターを含むバクテリオファージプロモーターから選択できる。

【０３２１】

（真菌プロモーター）

真菌種中で転写させるために有用なプロモーターの例は、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅのＴＡＫＡアミラーゼ、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ　ｍｉｅｈｅｉアスパラギン酸プロテイナーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ中性αアミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ酸安定性αアミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒグルコアミラーゼ、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ　ｍｉｅｈｅｉリパーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅアルカリプロテアーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅトリオースリン酸イソメラーゼまたはＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｄｕｌａｎｓアセトアミダーゼをコードする遺伝子から誘導されるプロモーターである。

【０３２２】

（酵母プロモーター）

酵母種において発現させるために適切なプロモーターの例としては、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのＧａｌ　１およびＧａｌ　１０プロモーターならびにＰｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓのＡＯＸ１もしくはＡＯＸ２プロモーターが含まれるが、それらに限定されない。

【０３２３】

（宿主生物）

（Ｉ）細菌宿主生物

適切な細菌宿主生物の例は、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｅｎｔｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｂｒｅｖｉｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｌｋａｌｏｐｈｉｌｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｏａｇｕｌａｎｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌａｕｔｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｍｅｇａｔｅｒｉｕｍおよびＢａｃｉｌｌｕｓ　ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓを含むバシラス種、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｍｕｒｉｎｕｓなどのストレプトミセス種、Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓなどのラクトコッカス種を含む乳酸菌種、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉを含むラクトバシラス種、リューコノストック（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ）種、ペジオコッカス（Ｐｅｄｉｏｃｏｃｃｕｓ）種および連鎖球菌種などのグラム陽性細菌種である。または、Ｅ．ｃｏｌｉを含む腸内細菌属またはシュードモナス属に属するグラム陰性細菌種の菌株もまた宿主生物として選択できる。

【０３２４】

（ＩＩ）酵母宿主生物

適切な酵母宿主生物は、ピチア種、ハンセヌラ種もしくはクリュイベロミセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）種、Ｙａｒｒｏｗｉｎｉａ種またはＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅを含むサッカロミセス種もしくは例えばＳ．Ｐｏｍｂｅ種などのシゾサッカロミセス種（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）に属する種などのバイオ技術的に重要な酵母種から選択できる。

【０３２５】
好ましくは、メチロトローフ酵母種であるＰｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓの菌株が宿主生物として使用される。好ましくは、宿主生物はハンセヌラ種である。
【０３２６】
（ＩＩＩ）真菌宿主生物
糸状菌の中で特に適切な宿主生物としては、アスペルギルス種、例えばＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｔｕｂｉｇｅｎｓｉｓ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ａｗａｍｏｒｉまたはＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｄｕｌａｎｓが含まれる。または、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）種、例えばＦｕｓａｒｉｕｍ　ｏｘｙｓｐｏｒｕｍまたはＲｈｉｚｏｍｕｃｏｒ　ｍｉｅｈｅｉなどのリゾムコール種の菌株を宿主生物として使用できる。その他の適切な菌株には、サーモミセス（Ｔｈｅｒｍｏｍｙｃｅｓ）種およびムコール（Ｍｕｃｏｒ）種が含まれる。
【０３２７】
（タンパク質の発現および精製）
ポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、ＰＳ４改変体ポリペプチド、フラグメント、ホモログ、改変体もしくはそれらの誘導体などのポリペプチドを発現するために使用できる。宿主細胞は、タンパク質の発現を可能にする適切な条件下で培養できる。ポリペプチドの発現は、それらが継続的に産生されるように構成的であってもよく、または発現を開始するための刺激を必要とするように誘導性であってもよい。誘導性発現の場合には、タンパク質産生は、必要なときに、例えばデキサメタゾンもしくはＩＰＴＧのような培養培地へのインデューサー物質の添加によって開始できる。
【０３２８】
ポリペプチドは、酵素的、化学的および／または浸透圧性の溶解および物理的破壊を含む当技術分野において公知である様々な技術によって宿主細胞から抽出できる。ポリペプチドは、ＴｎＴ（商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）ウサギ網赤血球系などのインビトロ無細胞系において組換え的に生成することもできる。
【実施例】
【０３２９】
（実施例１．ＰＳ４のクローニング）
Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａをＬＢ培地上で一晩増殖させ、標準方法によって染色体ＤＮＡを単離した（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　Ｊ，１９８９）。プライマーＰ１およびＰ２（表３参照）を用いるＰＣＲによって、ＰＳ４オープンリーディングフレーム（Ｚｈｏｕら，１９８９）を含有する２１９０ｂｐフラグメントをＰ．ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ染色体ＤＮＡから増幅させた。生じたフラグメントはプライマーＰ３およびＰ４を用いるネステッドＰＣＲにおけるテンプレートとして使用し、そのシグナル配列を使用せずにＰＳ４のオープンリーディングフレームを増幅させ、遺伝子の５’末端にＮｃｏＩ部位を、そして３’末端にＢａｍＨＩ部位を導入した。ＰＳ４を細胞内発現させるために、ＮｃｏＩ部位と一緒に、Ｎ末端メチオニンについてのコドンを導入した。１６０５ｂｐフラグメントをｐＣＲＢＬＵＮＴ　ＴＯＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）内にクローン化し、構築物の完全性を配列決定によって分析した。Ｐ３２プロモーターおよびｃｔｇａｓｅシグナル配列の制御下でＰＳ４を発現させるために、Ｅ．ｃｏｌｉバシラス　シャトルベクターｐＤＰ６６Ｋ（Ｐｅｎｎｉｎｇａら，１９９６）を改変した。生じたプラスミドのｐＣＳｍｔａをＢａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ内へ形質転換させた。
【０３３０】
ＰＳ４のデンプン結合ドメインを取り除いた第２発現構築物を作製した。ｐＣＳｍｔａ上でプライマーＰ３およびＰ６（表３）を用いたＰＣＲにおいて、ｍｔａ遺伝子の短縮バージョンを生成した。ｐＣＳｍｔａ内の全長ｍｔａ遺伝子を短縮バージョンと交換し、プラスミドｐＣＳｍｔａ－ＳＢＤを得た。

【０３３１】
（実施例２．ＰＳ４の部位特異的突然変異誘発）
２つの方法によって（２段階ＰＣＲに基づく方法、またはＱｕｉｃｋ　Ｅｘｃｈａｎｇｅ（ＱＥ）法のいずれかによって）ｍｔａ遺伝子内に突然変異を導入した。便宜性のために、ｍｔａ遺伝子を３つの部分に分割した；ＰｖｕＩ－ＦｓｐＩフラグメント、ＦｓｐＩ－ＰｓｔＩフラグメントおよびＰｓｔＩ－ＡｓｐＩフラグメント、以下ではさらに各々フラグメント１、２および３と呼ぶ。
【０３３２】
２段階ＰＣＲに基づく方法では、Ｐｆｕ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いて突然変異を導入した。初回ＰＣＲは、コーディング鎖について突然変異誘発プライマー（表４）に加えて下方鎖の下流にあるプライマー（２Ｒまたは３Ｒのいずれか、表３）を用いて実施した。この反応生成物をコーディング鎖の上流にあるプライマーと一緒に第２回ＰＣＲにおいて使用した。最終反応の生成物をｐＣＲＢＬＵＮＴ　ｔｏｐｏ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）内へクローニングし、配列決定した後に、このフラグメントをｐＣＳｍｔａ内の対応するフラグメントと交換した。
【０３３３】
Ｑｕｉｃｋ　Ｅｘｃｈａｎｇｅ法（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いて、ｍｔａ遺伝子、またはｍｔａ遺伝子の一部を含有するプラスミド上のＰＣＲにおいて２つの相補的プライマーを使用して突然変異を導入した。
【０３３４】
このために、３ＳＤＭプラスミドおよび３ｐＣＳΔプラスミドを含む便利な一組のプラスミドを構築した。ＳＤＭプラスミド各々は、その中に所望の突然変異がＱＥによって導入される上述したｍｔａ遺伝子のフラグメントのうちの１つを有していた。配列決定によって検証した後、フラグメントを対応するレシピエントｐＣＳΔプラスミド内へクローニングした。ｐＣＳΔプラスミドはｐＣＳｍｔａ由来の不活性の誘導体である。活性は、容易なスクリーニングを可能にしたＳＤＭプラスミドから、対応するフラグメントをクローニングすることによって回復した。
【０３３５】
（表３．ｍｔａ遺伝子をクローニングする際に使用されるプライマー、および２段階ＰＣＲを用いて部位特異的突然変異体を構築する際に使用される標準プライマー）
【０３３６】
【化７】

プライマー	プライマー配列	導入された部位 site
P1	5'- ATG ACG AGG TCC TTG TTT TTC	
P2	5'- CGC TAG TCG TCC ATG TCG	
P3	5'- GCC ATG GAT CAG GCC GGC AAG AGC CCG	NcoI
P4	5'- TGG ATC CTC AGA ACG AGC CGC TGG T	BamHI
P6	5'- GAA TTC AGC CGC CGT CAT TCC CGC C	EcoRI
2L	5'-AGA TTT ACG GCA TGT TTC GC	
2R	5'-TAG CCG CTA TGG AAG CTG AT	
3L	5'-TGA CCT TCG TCG ACA ACC AC	
3R	5'-GAT AGC TGC TGG TGA CGG TC	

（表４．ｍｔａに部位特異的突然変異を導入するために使用したプライマー）
【０３３７】

【化８】

突然変異	オリゴ配列	改変	鎖	目的
G134R	CTGCCGGCCGGCCAGcGCTTCTGGCG		+	SDM
G134R -	cgccagaagcgctggccggccggcag		-	SDM
I157L	GACGGTGACCGCTTCcTgGGCGGCGAGTCG		+	SDM
I151L -	cgactcgccgcccaggaagcggtcaccgtc		-	SDM
G223A	GGCGAGCTGTGGAAAgccCCTTCTGAATATCCG		+	SDM
G223A -	cggatattcagaaggggctttccacagctcgcc		-	SDM
H307L	gaacGGCGGCCAGCACctgTGGGCGCTGCAG		+	SDM
H307L -	ctgcagcgcccacaggtgctggccgccgttc		-	SDM
S334P, D343E	GTACTGGccgCACATGTACGACTGGGGCTACGGC gaaTTCATC		+	SDM
S334P, D343E -	gatgaattcgccgtagccccagtcgtacatgtgcggccagtac		-	SDM

（表５．ＳＤＭおよびｐＣＳΔプラスミドの特徴）

【０３３８】

【化９】

プラスミド	特徴／構造
SDM1	pBlueSK+ 480 bp SalI-StuI フラグメント mta
SDM2	pBlueSK+ 572 bp SacII-PstI フラグメント mta
SDM3	pBlueSK+ 471 bp SalI-StuI フラグメント mta
pCSΔ1	Klenow で埋めた FseI 部位 ----> mta におけるフレームシフト
pCSΔ2	「ジャンク－ＤＮＡ」で置換された mta の FspI-PstI フラグメント
pCSΔ3	「ジャンク－ＤＮＡ」で置換された mta の PstI-AspI フラグメント

（実施例３．マルチＳＤＭ）

ＰＳ４改変体を、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）多重部位特異的突然変異誘発キット（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を下記のように一部の変更を加えて製造業者のプロトコールにしたがって使用して生成した。

【０３３９】

（工程１：突然変異体鎖合成反応（ＰＣＲ））

３ｍｌのＬＢ（２２ｇ／ｌのＬｅｎｎｏｘ　Ｌ　Ｂｒｏｔｈ　Ｂａｓｅ、Ｓｉｇｍａ）＋抗生物質（０．０５μｇ／ｍｌのカナマイシン、Ｓｉｇｍａ）を１０ｍｌのＦａｌｃｏｎ試験管中で接種する。

【０３４０】

・　３７℃、約２００ｒｐｍでインキュベートする。

【０３４１】

・　遠心分離分離によって細胞を遠心沈殿させる（５，０００ｒｐｍ／５分）。

【０３４２】

・　培地を廃棄する。

【０３４３】

・　ＱＩＡＧＥＮ　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｍｉｎｉ精製プロトコールを用いてｄｓ－ＤＮＡテンプレートを調製する。

【０３４４】

１．サーマルサイクリングのための突然変異体鎖合成反応液は以下のとおりに調製した：

（ＰＣＲミックス：）

２．５μｌの１０×　ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）Ｍｕｌｔｉ反応バッファー

０．７５μｌのＱｕｉｃｋＳｏｌｕｔｉｏｎ

Ｘμｌのプライマー

プライマー長２８～３５ｂｐ　→　１０ｐｍｏｌ

プライマー長２４～２７ｂｐ　→　７ｐｍｏｌ

プライマー長２０～２３ｂｐ　→　５ｐｍｏｌ
１μｌのｄＮＴＰミックス
Ｘμｌのｄｓ－ＤＮＡテンプレート（２００ｎｇ）
１μｌのＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）Ｍｕｌｔｉ酵素混合物（２．５単位／μｌ）（ＰｆｕＴｕｒｂｏ（登録商標）ＤＮＡポリメラーゼ）
ＸμｌのdH_2O（２５μｌの最終容量まで）
全構成成分をピペッティングによって混合し、反応混合物を短時間で遠心沈殿する。
【０３４５】
２．以下のパラメーターを用いて反応を反復実施する：
３５サイクルの変性（９６℃／１分間）
プライマーのアニーリング（６２．８℃／１分間）
伸長（６５℃／１５分間）
その後４℃で保持する。
【０３４６】
ＰＣＲ装置の蓋を１０５℃に、プレートを９５℃に予備加熱し、その後にＰＣＲ管を装置内（エッペンドルフ型サーマルサイクラー）へ置く。
【０３４７】
（工程２：ＤｐｎＩの消化）
１．２μｌのＤｐｎＩ制限酵素（１０単位／μｌ）を各増幅反応液に加え、ピペッティングによって混合し、混合物液を遠心沈殿させる。
【０３４８】
２．３７℃で約３時間インキュベートする。
【０３４９】
（工程３：ＸＬ１０－Ｇｏｌｄ（登録商標）Ｕｌｔｒａｃｏｍｐｅｔｅｎｔ細胞の形質転換）
１．氷上でＸＬ１０－Ｇｏｌｄを解凍する。事前に冷却したＦａｌｃｏｎ試験管へ１回の突然変異誘発反応につき４５μｌの細胞を分取する。
【０３５０】
２．水浴（４２℃）のスイッチを入れ、予備加熱するために水浴中へNZY^+ブロスを含む試験管を配置する。
【０３５１】
３．２μｌのβ－メルカプトエタノールミックスを各試験管に加える。試験管を回転させて軽くたたき、２分毎に回転させながら氷上で１０分間インキュベートする。
【０３５２】
４．細胞の各アリコートに１．５μｌのＤｐｎＩ処理ＤＮＡを加え、混合するために回転させ、氷上で３０分間インキュベートする。
【０３５３】
５．３０秒間にわたり４２℃の水浴中で試験管をヒートパルスし、氷上に２分間置く。
【０３５４】
６．各試験管に事前に加熱した０．５ｍｌのNZY^+ブロスを加え、２２５～２５０ｒｐｍで攪拌しながら１時間にわたり３７℃でインキュベートする。
【０３５５】
７．１％デンプンおよび０．０５μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢプレート（３３．６ｇ／ｌ　Ｌｅｎｎｏｘ　Ｌ　Ａｇａｒ、Ｓｉｇｍａ）上で２００μｌの各形質転換反応液を平板培養する。
【０３５６】
８．形質転換プレートを３７℃で一晩インキュベートする。
【０３５７】
（表６．ｐＰＤ７７ｄ１４についてのプライマー表：）
【０３５８】

【化１０】

突然変異	オリゴ配列	改変	鎖	目的
N33Y, D34N	GCGAAGCGCCCTACAACTGGTACAAC	5'リン酸	+	MSDM
K71R	CCGACGGCGGCAGGTCCGGCG	5'リン酸	+	MSDM
G87S	CAAGAACAGCCGCTACGGCAGCGAC	5'リン酸	+	MSDM
G121D	CACATGAACCGCGACTACCCGGACAAG	5'リン酸	+	MSDM
G134R	CTGCCGGCCGGCCAGcGCTTCTGGCG	5'リン酸	+	MSDM
A141P	CGCAACGACTGCGCCGACCCGGG	5'リン酸	+	MSDM
I157L	GACGGTGACCGCTTCcTgGGCGGCGAGTCG	5'リン酸	+	MSDM
L178F, A179T	CGCGACGAGTTTACCAACCTGCG	5'リン酸	+	MSDM
G223A	GGCGAGCTGTGGAAAgccCCTTCTGAATATCCG	5'リン酸	+	MSDM
H307L	gaacGGCGGCCAGCACctgTGGGCGCTGCAG	5'リン酸	+	MSDM
S334P, D343E	GTACTGGccgCACATGTACGACTGGGGCTACGGC gaaTTCATC	5'リン酸	+	MSDM

（表７．ｐＰＤ７７ｄ２０についてのプライマー表：）

【０３５９】

【化１１】

突然変異	オリゴ配列	改変	鎖	目的
N33Y, D34N	GCGAAGCGCCCTACAACTGGTACAAC	5'リン酸	+	MSDM
K71R	CCGACGGCGGCAGGTCCGGCG	5'リン酸	+	MSDM
G121D	CACATGAACCGCGACTACCCGGACAAG	5'リン酸	+	MSDM
G134R	CTGCCGGCCGGCCAGcGCTTCTGGCG	5'リン酸	+	MSDM
A141P	CGCAACGACTGCGCCGACCCGGG	5'リン酸	+	MSDM
I157L	GACGGTGACCGCTTCcTgGGCGGCGAGTCG	5'リン酸	+	MSDM
L178F, A179T	CGCGACGAGTTTACCAACCTGCG	5'リン酸	+	MSDM
G223A	GGCGAGCTGTGGAAAgccCCTTCTGAATATCCG	5'リン酸	+	MSDM
H307L	gaacGGCGGCCAGCACctgTGGGCGCTGCAG	5'リン酸	+	MSDM
S334P, D343E	GTACTGGccgCACATGTACGACTGGGGCTACGGC gaaTTCATC	5'リン酸	+	MSDM

（表８．ｐＰＤ７７ｄ３４についてのプライマー表：）

【０３６０】

【化１２】

突然変異	オリゴ配列	改変	鎖	目的
N33Y, D34N	GCGAAGCGCCCTACAACTGGTACAAC	5'リン酸	+	MSDM
G121D	CACATGAACCGCGACTACCCGGACAAG	5'リン酸	+	MSDM
G134R	CTGCCGGCCGGCCAGcGCTTCTGGCG	5'リン酸	+	MSDM
A141P	CGCAACGACTGCGCCGACCCGGG	5'リン酸	+	MSDM
I157L	GACGGTGACCGCTTCcTgGGCGGCGAGTCG	5'リン酸	+	MSDM
L178F, A179T	CGCGACGAGTTTACCAACCTGCG	5'リン酸	+	MSDM
G223A	GGCGAGCTGTGGAAAgccCCTTCTGAATATCCG	5'リン酸	+	MSDM
H307L	gaacGGCGGCCAGCACctgTGGGCGCTGCAG	5'リン酸	+	MSDM
S334P	GTACTGGccgCACATGTACGACTGGGGCTACGGC	5'リン酸	+	MSDM

（ｐＰＤ７７に基づくベクター系）

ｐＰＤ７７のために使用されるベクター系は、ｐＣＲｂｌｕｎｔＴＯＰＯＩＩ（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に基づいている。ゼオシン（ｚｅｏｃｉｎ）耐性カセットは、ｐｍｌＩ、３９３ｂｐフラグメントによって取り除かれている。次に、ｐＣＣベクター（Ｐ３２－ｓｓＣＧＴａｓｅ－ＰＳ４－ｔｔ）由来の発現カセットが、ベクター内に挿入されている。

【０３６１】

（ＰＳ４改変体のｐＣＣＭｉｎｉ内へのライゲーション）

関連する突然変異（ＭＳＤＭによって作製された）を含有するプラスミドを、制限酵素Ｎｃｏ１およびＨｉｎｄＩＩＩ（Ｂｉｏｌａｂｓ）を用いて切断する：

３μｇのプラスミドＤＮＡ、Ｘμｌの１０×バッファー２、１０単位のＮｃｏ１、２０単位のＨｉｎｄＩＩＩ、３７℃、２時間のインキュベーション。

【０３６２】

１％アガロースゲル上での消化物を泳動する。サイズが１２９３ｂｐ（ＰＳ４遺伝子）のフラグメントをゲルから切り出し、Ｑｉａｇｅｎゲル精製キットを用いて精製する。

【０３６３】

（ベクターｐＣＣＭｉｎｉは次に制限酵素Ｎｃｏ１およびＨｉｎｄＩＩＩを用いて切断し、次に消化を１％アガロースゲル上で実施する。サイズが３５６９ｂｐのフラグメントはゲルから切断し、Ｑｉａｇｅｎゲル精製キットを用いて精製する。

【０３６４】

ライゲーション：急速ＤＮＡライゲーションキット（Ｒｏｃｈｅ）を使用。

【０３６５】

ベクターと比較して２倍量のインサートを使用する。

【０３６６】

例えば、２μｌのインサート（ＰＳ４遺伝子）
１μｌのベクター
５μｌのＴ４　ＤＮＡライゲーションバッファー（濃度２倍）
１μｌのｄH_2Ｏ
１μｌのＴ４　ＤＮＡリガーゼ

５分間／ＲＴでライゲーションする。

【０３６７】

製造業者（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）のプロトコールにしたがってＯｎｅ　Ｓｈｏｔ　ＴＯＰＯコンピテント細胞内へライゲーション液を形質転換させる。１回の形質転換に付き５μｌのライゲーション液を使用する。

【０３６８】

１％デンプンおよび０．０５μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢプレート（３３．６ｇ／ｌ　Ｌｅｎｎｏｘ　Ｌ　Ａｇａｒ、Ｓｉｇｍａ）上で５０μｌの形質転換形成ミックスを平板培養する。インサート（ＰＳ４改変体）を含有するベクターを、デンプンプレート上でのハロ形成によって認識できる。

【０３６９】

（実施例４．Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ内への形質転換（プロトプラスト形質転換））

Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ（菌株ＤＢ１０４Ａ；Ｓｍｉｔｈら，１９８８；Ｇｅｎｅ　７０，３５１－３６１）を、以下のプロトコールにしたがって突然変異ｐＣＳ－プラスミドを用いて形質転換させた。

【０３７０】

Ａ．プロトプラスト培養および形質転換のための培地

２×ＳＭＭ　　１リットルに付き：３４２ｇのスクロース（１Ｍ）；４．７２ｇのマレイン酸ナトリウム（０．０４Ｍ）；８：１２ｇの$MgCl_2$、６H_2O（０．０４Ｍ）；濃ＮａＯＨを用いてｐＨ６．５にする。５０ｍｌ部分に分配し、１０分間にわたりオートクレーブ滅菌にかける。

【０３７１】

４×ＹＴ（１／２　ＮａＣｌ）　１００ｍｌにつき２ｇの酵母抽出物＋３．２ｇのトリプトン＋０．５ｇのＮａＣｌ。

【０３７２】

ＳＭＭＰ　　当量の２×ＳＭＭおよび４×ＹＴを混合する。

【０３７３】

ＰＥＧ　　２５ｍｌの１×ＳＭＭ（１０分間にわたりオートクレーブ滅菌する）中の１０ｇのポリエチレングルコール６０００（ＢＤＨ）または８０００（Ｓｉｇｍａ）。

【０３７４】

Ｂ．平板培養／再生用の培地

寒天　　４％のＤｉｆｃｏ最小寒天。１５分間にわたりオートクレーブ滅菌する。

【０３７５】

コハク酸ナトリウム　　２７０ｇ／Ｌ（１Ｍ）、ＨＣｌを用いてｐＨ７．３にする。１５分間にわたりオートクレーブ滅菌する。

【０３７６】

リン酸バッファー　　１００ｍｌにつき３．５ｇのK_2HPO_4＋１．５ｇのKH_2PO_4。１５分間にわたりオートクレーブ滅菌する。

【０３７７】

$MgCl_2$　　１００ｍｌにつき２０．３ｇの$MgCl_2$、$6H_2O$（１Ｍ）。

【０３７８】

カザミノ酸　　５％（ｗ／ｖ）溶液。１５分間にわたりオートクレーブ滅菌する。

【０３７９】

酵母抽出液　　１００ｍｌにつき１０ｇを１５分間にわたりオートクレーブ滅菌する。

【０３８０】

グルコース　　２０％（ｗ／ｖ）溶液。１０分間にわたりオートクレーブ滅菌する。

【０３８１】

ＤＭ３再生培地：６０℃で混合する（水浴；５００ｍｌボトル）：

２５０ｍｌのコハク酸ナトリウム
５０ｍｌのカザミノ酸
２５ｍｌの酵母抽出液
５０ｍｌのリン酸バッファー
１５ｍｌのグルコース
１０ｍｌの$MgCl_2$
１００ｍｌの溶融寒天

適切な抗生物質を加える：クロラムフェニコールおよびテトラサイクリン、５μｇ／ｍｌ；エリスロマイシン、１μｇ／ｍｌ。カナマイシン上の選択はＤＭ３培地中では問題が生じる（２５０μｇ／ｍｌの濃度が必要になることがある）。

【０３８２】

Ｃ．プロトプラストの調製

１．全試験を通して洗剤無含有プラスチックまたはガラス製品を使用する。

【０３８３】

２．単一コロニーから１００ｍｌフラスコ内の２×ＹＴ培地１０ｍｌを接種する。２５～３０℃のシェーカー内で培養液を一晩増殖させる（２００回転／分）。

【０３８４】

３．１００ｍｌの新鮮２×ＹＴ培地（２５０ｍｌフラスコ）内へ一晩培養液を２０倍に希釈し、３７℃のシェーカー内でOD_{600}＝０．４～０．５（約２時間）となるまで増殖させる（２００～２５０回転／分）。

【０３８５】

４．遠心分離によって細胞を採取する（９０００ｇ，２０分間、４℃）。

【０３８６】

５．ピペットを用いて上清を取り出し、細胞を５ｍｌのＳＭＭＰ＋５ｍｇのリゾチーム中に再懸濁させ、濾過滅菌する。

【０３８７】

６．３７℃の水浴シェーカー（１００回転／分）内でインキュベートする。

【０３８８】

３０分後、およびその後は１５分間隔で、顕微鏡によって２５μｌのサンプルを検査する。９９％の細胞がプロトプラストされる（球状の外観になる）までインキュベーションを継続する。プロトプラストを遠心分離（４０００ｇ、２０分間、室温）によって採取し

、上清をピペットで取り除く。ペレットを１～２ｍｌのＳＭＭＰ中に穏やかに再懸濁させる。
【０３８９】
これでプロトプラストの使用準備が整う。将来使用するために（小部分（例えば、０．１５ｍｌ）に分けて－８０℃で冷凍できる（グリセロールの添加は必要としない）。これは形質転換能力のある程度の低下を生じさせることがあるが、冷凍プロトプラストを用いて１μｇのＤＮＡにつき１０^{6}の形質転換体が得られ得る。
【０３９０】
Ｄ．形質転換
１．４５０μｌのＰＥＧをマイクロチューブへ移す。
【０３９１】
２．１～１０μｌのＤＮＡ（０．２μｇ）を１５０μｌのプロトプラストと混合し、この混合液をＰＥＧ入りのマイクロチューブへ添加する。即時に、しかし穏やかに混合する。
【０３９２】
３．室温に２分間放置し、次に１．５ｍｌのＳＭＭＰを加えて混合する。
【０３９３】
４．微量遠心分離（１０分間、１３，０００回転／分（１０～１２．０００ｇ））によってプロトプラストを採取し、上清を除去する。ティッシュペーパーを用いて残留している液滴を除去する。
【０３９４】
３００μｌのＳＭＭＰを加え（ボルテックスミキサーにはかけない）、抗生物質耐性マーカーを発現させるように３７℃の水浴シェーカー（１００回転／分）中で６０～９０分間インキュベートする。（プロトプラストは水浴の攪拌作用を通して十分に再懸濁させられる）。１×ＳＳＭ中で適切な希釈液を作製し、ＤＭ３プレート上で０．１ｍｌを平板培養する。
【０３９５】
（実施例５．攪拌フラスコ内でのＰＳ４改変体の発酵
攪拌フラスコ内の基質は以下のとおりに調製した：
【０３９６】
【化１３】

成分	%(重量／容量)
水	-
酵母抽出液	2
大豆粉	2
NaCl	0.5
リン酸二カリウム	0.5
消泡剤	0.05

基質は、オートクレーブ滅菌の前に４Ｎ硫酸または水酸化ナトリウムを用いてｐＨ６．８へ調整した。１００ｍｌの基質を１枚のバッフル付き５００ｍｌフラスコ内に入れ、３０分間にわたりオートクレーブ滅菌した。引き続き、６ｍｌの無菌デキストロースシロップを加えた。デキストロースシロップは、１容積の５０％（ｗ／ｖ）デキストロースを１容積の水と混合し、次に２０分間にわたりオートクレーブ滅菌することによって調製した。
【０３９７】
攪拌フラスコに改変体を接種し、インキュベーター内で３５℃／１８０ｒｐｍで２４時間インキュベートした。インキュベーション後に、細胞は遠心分離（１０，０００×ｇ、１０分間）によってブロスから分離し、最後に上清は０．２μｍでの精密濾過によって細

胞無含有にした。細胞無含有上清をアッセイおよび適用試験に使用した。

【０３９８】

（実施例６．アミラーゼアッセイ）

（Ｂｅｔａｍｙｌアッセイ）

１Ｂｅｔａｍｙｌ単位は、１分間に付き０．０３５１ｍＭのＰＮＰがアッセイミックス中の過剰なαグルコシダーゼによって放出され得るように、１分間に付き０．０３５１ｍＭのＰＮＰ結合マルトペンタオースを分解させる活性であると定義されている。アッセイミックスは、Ｍｅｇａｚｙｍｅ（アイルランド）の２５μｌの酵素サンプルおよび２５μｌのＢｅｔａｍｙｌ基質（Ｇｌｃ５−ＰＮＰおよびａ−グルコシダーゼ）（１バイアルを１０ｍｌの水に溶解させた）とともに５０μｌの５０ｍＭのクエン酸ナトリウム、５ｍＭの$CaCl_2$（ｐＨ６．５）を含有していた。アッセイミックスを４０℃で３０分間インキュベートし、次に１５０μｌの４％　Ｔｒｉｓを加えて停止させた。ＥＬＩＳＡリーダーを用いて４２０ｎｍでの吸光度を測定し、Ｂｅｔａｍｙｌ活性を活性＝Ａ４２０＊ｄ（アッセイ対象の酵素サンプル１ｍｌあたりＢｅｔａｍｙｌ単位）に基づいて計算した。

【０３９９】

（エンドアミラーゼアッセイ）

エンドアミラーゼアッセイは、製造業者（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　＆　Ｕｐｊｏｈｎ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　ＡＢ）によるＰｈａｄｅｂａｓアッセイ実行と同一であった。

【０４００】

（エキソ特異性）

エキソ特異性は、エキソアミラーゼ活性対Ｐｈａｄｅｂａｓ活性の比率を使用して評価した。

【０４０１】

（比活性）

ＰＳａｃ−Ｄ１４改変体、ＰＳａｃ−Ｄ２０改変体およびＰＳａｃ−Ｄ３４改変体について、本発明者らはＢｒａｄｆｏｒｄ（１９７６；Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７２，２４８）に従って測定した精製タンパク質１μｇにつき１０Ｂｅｔａｍｙｌ単位の平均比活性を見いだした。この比活性を、適用試験に使用する用量を計算するために活性に基づいて使用した。

【０４０２】

（実施例７．半減期の決定）

ｔ１／２は、規定加熱条件下でその間に酵素活性の半分が不活化される時間（単位：分間）である。酵素の半減期を決定するために、サンプルを６０℃〜９０℃の一定温度で１〜１０分間にわたり加熱した。半減期は、残留Ｂｅｔａｍｙｌアッセイに基づいて計算した。

【０４０３】

方法：エッペンドルフバイアル中で、１，０００μｌのバッファーを６０℃以上で少なくとも１０分間予備加熱する。サンプルの熱処理は熱インキュベーター（ＥｐｐｅｎｄｏｒｆのＴｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ　ｃｏｍｆｏｒｔ）内でのエッペンドルフバイアルを継続的に混合（８００ｒｐｍ）しながら予備加熱バッファーに１００μｌのサンプルを添加することによって開始される。０、２、４、６、８および９分間のインキュベーション後、４５μｌのサンプルを２０℃で平衡化した１，０００μｌのバッファーへ移し、１，５００ｒｐｍおよび２０℃で１分間インキュベートすることによって処理を停止させる。残留活性を、Ｂｅｔａｍｙｌアッセイを用いて測定する。

【０４０４】

計算：ｔ１／２の計算は、残留Ｂｅｔａｍｙｌ活性対インキュベーション時間のｌｏｇ１０（ベース−対数１０）の勾配に基づいており、ｔ１／２は勾配／０．３０１＝ｔ１／２として計算する。

【０４０５】

（実施例８．モデル系のベーキング試験）

生地は３０．０℃のファリノグラフ内で作製した。１０．００ｇの改善（ｒｅｆｏｒｍ）した粉を計量し、ファリノグラフ内に加えた；１分間混合した後、捏ね上げバット（ｋｎｅａｄｉｎｇ　ｖａｔ）の穴を通して無菌ピペットを用いて参照物質／サンプル（参照物質＝バッファーもしくは水、サンプル＝酵素＋バッファーもしくは水）を加える。３０秒後、同様に捏ね上げバットの穴を通して、粉を辺縁からこすり落とす。サンプルを７分間捏ねる。

【０４０６】

最終参照物質を実行する前にファリノグラフでバッファーもしくは水を用いた試験を実施した。ＦＵは参照物質上では４００でなければならず、そうでない場合は、例えば液体の量によって調整しなければならなかった。参照物質／サンプルをスパチュラで取り出し、（ディスポーザブルグローブをはめた）手の中に入れ、その後小さなガラス製試験管（長さ約４．５ｃｍ）内に満たし、これをＮＭＲ試験管に入れてコルク栓をする。１種の生地に付き７本の試験管を作製する。

【０４０７】

サンプルを全部調製したら、試験管を（コルク栓なしで）２５分間にわたり３３℃の（プログラム可能な）水浴中に入れ、その後水浴を５分間は３３℃に維持し、次に５６分間にわたり９８℃へ加熱し（１分に付き１．１℃）、最後に９６℃で５分間維持するように設定する。

【０４０８】

試験管は２０．０℃のサーモカップボード内に保管する。クラムの固体含量は、図２に０ｐｐｍ、０．５ｐｐｍ、１ｐｐｍおよび２ｐｐｍのＰＳａｃＤ３４を用いて調製したクラムサンプルについて示したように、第１、３および７日にＢｒｕｋｅｒ　ＮＭＳ　１２０　Ｍｉｎｉｓｐｅｃ　ＮＭＲ分析装置を用いて陽子ＮＭＲによって測定する。経時的な固体含量のより低い増加は、アミロペクチン老化の減少を表している。２０．０℃のサーモカップボード内での７日間の保管後に、１０～２０ｍｇのクラムサンプルを計量し、４０μｌのアルミニウム製標準ＤＳＣカプセル内に入れ、２０℃で保管する。

【０４０９】

このカプセルをＭｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　ＤＳＣ　８２０装置上での示差走査熱量測定のために使用する。パラメーターとしては、１分間の加熱に付き１０℃での２０～９５℃の加熱サイクルおよびガス／流量：$Ｎ_2$／８０ｍｌ／分を使用する。結果を分析し、老化アミロペクチンを融解させるためのエントロピーをＪ／ｇで計算する。

【０４１０】

（実施例９．硬化防止作用）

モデルのパンクラム（ｂｒｅａｄ　ｃｒｕｍｂ）は、実施例８にしたがって調製して測定する。表２に示したように、ＰＳ４改変体は、示差走査熱量測定によって測定すると、コントロールと比較してベーキング後にアミロペクチン老化の強い減少を示す。ＰＳ４改変体は、明白な用量作用を示す。

【０４１１】

（実施例１０．ベーキング試験における堅さの作用）

ベーキング試験を、米国式トーストのための標準白パンのスポンジおよび生地のレシピを用いて実施した。スポンジ生地はＳｉｓｃｏ　Ｍｉｌｌｓ（ＵＳＡ）の１，６００ｇの粉「Ａｌｌ　Ｐｕｒｐｏｓｅ　Ｃｌａｓｓｉｃ」、９５０ｇの水、４０ｇの大豆油および３２ｇのドライイーストから調製する。スポンジを、Ｈｏｂａｒｔスパイラル・ミキサーを用いて低速で１分間、続いて速度２で３分間混合した。スポンジは引き続いて３５℃、８５％　ＲＨで２．５時間、次に５℃で０．５時間にわたり発酵させる。

【０４１２】

その後、このスポンジに４００ｇの粉、４ｇのドライイースト、４０ｇの塩、２．４ｇのプロピオン酸カルシウム、２４０ｇの高フルクトースコーンシロップ（Ｉｓｏｓｗｅｅｔ）、５ｇの乳化剤ＰＡＮＯＤＡＮ　２０５、５ｇの酵素活性大豆粉、３０ｇの非活性大豆粉、２２０ｇの水および３０ｇのアスコルビン酸溶液（水５００ｇに溶解させた４ｇの

アスコルビン酸から調製した）を添加する。生じた生地は、Ｄｉｏｓｎａミキサーを用いて低速で１分間、続いて速度２で６分間混合した。その後、その生地を周囲温度で５分間寝かし、次に５５０ｇの生地片を量り、次に各辺を１：４、２：４、３：１５、４：１２および１０に設定したＧｌｉｍｅｋシーター上でシート成形し、ベーキング型に移す。９０％ＲＨの４３℃での６０分間のプルーフィング後に、この生地を２１８℃で２９分間ベーキングする。

【０４１３】

堅さと弾性を、ＴＡ－ＸＴ２テクスチャー分析装置で測定した。柔らかさ、密着性および弾性は、Ｓｔａｂｌｅ　Ｍｉｃｒｏ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（ＵＫ）のテクスチャー分析装置を用いるテクスチャープロフィル分析によってパン薄片を分析することによって決定した。以下の設定を使用した：

試験前速度：２ｍｍ／ｓ

試験速度：２ｍｍ／ｓ

試験後速度：１０ｍｍ／ｓ

破壊試験間隔：１％

間隔：４０％

力：０．０９８Ｎ

時間：５．００秒間

カウント：５

ロードセル：５ｋｇ

トリガータイプ：自動－０．０１Ｎ

堅さの測定値は、ＰＳ４改変体ポリペプチドが第１日から第７日の堅さの発達を有意に減少させることを示しており、そして酵素用量の増加に伴ってより高い作用を示す。

【０４１４】

（実施例１１．デニッシュ・ロールの容積の制御）

デニッシュ・ロールを２，０００ｇのデニッシュ用改善粉（Ｃｅｒｅａｌｉａ）、１２０ｇの圧搾イースト、３２ｇの塩、および３２ｇのスクロースをベースとする生地から調製する。事前の水の最適化に従って生地に水を加える。

【０４１５】

生地を、Ｄｉｏｓｎａミキサーを用いて（低速で２分間、および高速で５分間）混合する。混合後の生地の温度を２６℃で維持する。１，３５０ｇの生地を量り、３０℃の加熱キャビネット内で１０分間寝かせる。デニッシュ・ロールをＦｏｒｔｕａ成形機上で成形し、３４℃および８５％相対湿度で４５分間プルーフィングする。引き続いてデニッシュ・ロールを最初の１３秒間は蒸気を出して、２５０℃のＢａｇｏ　２オーブン内で１８分間ベーキングする。ベーキング後にデニッシュ・ロールを２５分間冷まし、その後に計量して容積を測定する。

【０４１６】

デニッシュ・ロールは、クラストの外観、クラムの均質性、クラストのキャッピング、パンの模様（ａｕｓｂｕｎｄ）および比容積（菜種置換法（ｒａｐｅ　ｓｅｅｄ　ｄｉｓｐｌａｃｅｍｅｎｔ　ｍｅｔｈｏｄ）を用いて容積を測定する）に関して評価する。

【０４１７】

これらの基準に基づき、ＰＳ４改変体は比容積を増加させ、デニッシュ・ロールの品質パラメーターを改善することが見いだされる。従って、ＰＳ４改変体は、ベーキング製品の容積を制御することができる。

【０４１８】

（実施例１２．結果）

（表９．野生型ＰＳａｃ－ｃｃ１と比較したＰｓａｃ改変体の生化学的特性）

【０４１９】

【化１４】

改変体	t½-75	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
PSac-cc1	<0,5		40	
PSac-D3	9.3	3	43	N33Y, D34N, K71R, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L, D343E, S334P
PSac-D14 (配列番号 4)	9.3	2.7	65	N33Y, D34N, K71R, G87S, G121D, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L, D343E, S334P
PSac-D20 (配列番号 3)	7.1	2.7	86	N33Y, D34N, K71R, G121D, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L, D343E, S334P
PSac-D34 (配列番号 2)	8.4	2.9	67	N33Y,D34N, G121D, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L, S334P
PSac-pPD77d33 (配列番号 13)	7.1	3	51	N33Y, D34N, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L, S334P
pMD55		6.0	54	N33Y D34N **G121F** G134R, A141P I157L G223A H307L S334P L178F A179T
pMD85		5.1	115	N33Y D34N **G121F** G134R, A141P I157L **G223E** H307L S334P L178F A179T
PMD96		4.0	231	N33Y D34N **G121F** G134R, A141P I157L **G223E** H307L S334P L178F A179T **S161A**
pMD86		3.6	170	N33Y D34N **G121A** G134R, A141P I157L **G223E** H307L S334P L178F A179T
pMD109		3.6	170	N33Y D34N **G121A** G134R, A141P I157L **G223E** H307L S334P L178F A179T **S161A**

配列ｐＰＤ７７ｄ４０、ｐＭＤ５５、ｐＭＤ８５、ｐＭＤ９６、ｐＭＤ８６およびｐＭＤ１０９は、第５列で変異した残基およびＰ．ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ野生型バックグラウンド（配列番号１）において欠失したデンプン結合ドメインを有する。それらの配列は、この情報を用いると簡単な方法で構築できる。

【０４２０】

様々な位置での個々の突然変異の詳細な作用について以下の小節で記載する。

【０４２１】

（突然変異１２１Ｆを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔでのアミノ酸突然変異を有するｐＭＤ５５と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性を示した。上記の実施例１２および表９も参照されたい。

【０４２２】

【化１５】

改変体	t½-75	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
PSac-pPD77d33 (配列番号 13)	7.1	3	51	N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P
pMD55		6.0	54	N33Y D34N **G121F** G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P

（突然変異１６１Ａを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強されたエキソ特異性）
Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するｐＭＤ９６と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドをエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善されたエキソ特異性を示した。上記の実施例１２および表９も参照されたい。
【０４２３】
【化１６】

改変体	t½-75	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD85		5.1	115	N33Y D34N **G121F** G134R A141P I157L L178F A179T **G223E** H307L S334P
PMD96		4.0	231	N33Y D34N **G121F** G134R A141P I157L **S161A** L178F A179T **G223E** H307L S334P

（突然変異２２３Ｅを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強されたエキソ特異性）
Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するｐＭＤ８５と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドをエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善されたエキソ特異性を示した。上記の実施例１２および表９も参照されたい。
【０４２４】
【化１７】

改変体	t½-75	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD55		6.0	54	N33Y D34N **G121F** G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P
pMD85		5.1	115	N33Y D34N **G121F** G134R, A141P I157L L178F A179T **G223E** H307L S334P

（実施例１３．突然変異１２１Ｄを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性およびエキソ特異性）
Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ１２１Ｄ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するｐＭＤ３と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性およびエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性および改善されたエキソ特異性を示した。
【０４２５】
【化１８】

改変体	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD28	2,3	41	N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P
pMD3	2,8	99	N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T **G121D** H307L S334P

（実施例１４．突然変異１２１Ｗを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性およびエキソ特異性）
Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ

、Ｇ１２１Ｗ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するｐＭＤ４４と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性およびエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性および改善されたエキソ特異性を示した。

【０４２６】

【化１９】

改変体	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD28	2,3	41	N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P
pMD44	4,8	172	N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T **G121W** H307L S334P

（実施例１５．突然変異１２１Ｈを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性およびエキソ特異性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ１２１Ｈ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４ＰでのアミノＳ酸突然変異を有するｐＭＤ４３ａと名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性およびエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性および改善されたエキソ特異性を示した。

【０４２７】

【化２０】

改変体	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD28	2,3	41	N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P
pMD43 a	3,7	110	N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T **G121H** H307L S334P

（実施例１６．突然変異１２１Ｍを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性およびエキソ特異性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ１２１Ｍ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４ＰでのアミノＳ酸突然変異を有するｐＭＤ４１ａと名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性およびエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性および改善されたエキソ特異性を示した。

【０４２８】

【化２１】

改変体	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD28	2,3	41	N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P
pMD41 a	3,3	145	N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T **G121M** H307L S334P

（実施例１７．突然変異１２１Ａを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性およびエキソ特異性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ１２１Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４ＰでのアミノＳ酸突然変異を有するｐＭＤ７４ａと名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性およびエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性および改善されたエキソ特異性を示した。

【０４２９】

【化２２】

改変体	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD28	2,3	41	N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P
pMD74 a	3,3	87	N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T **G121A** H307L S334P

（実施例１８．突然変異１２１Ｙを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性およびエキソ特異性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ１２１Ｙ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するｐＭＤ７３ａと名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性およびエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性および改善されたエキソ特異性を示した。

【０４３０】

【化２３】

改変体	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD28	2,3	41	N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P
pMD73	4,8	101	N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T **G121Y** H307L S334P

（実施例１９．突然変異２２３Ａを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性およびエキソ特異性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｄ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４ＰでのアミノＮ酸突然変異を有するｐＭＤ３と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性およびエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性および改善されたエキソ特異性を示した。

【０４３１】

【化２４】

改変体	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD25	1,3	58	N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T H307L S334P
pMD3	2,8	99	N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T **G223A** H307L S334P

（実施例２０．突然変異２２３Ｋを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性およびエキソ特異性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｄ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｋ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ１７３Ｆ６と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性およびエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性および改善されたエキソ特異性を示した。

【０４３２】

【化２５】

改変体	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD25	1,3	58	N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T H307L S334P
SSM173 F6	1,6	118	N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T **G223K** H307L S334P

（実施例２１．突然変異２２３Ｖを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性およびエキソ特異性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｄ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｖ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４ＰでのアミノDRAFT酸突然変異を有するｐＭＤ４９ａと名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドをエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性および改善されたエキソ特異性を示した。

【０４３３】

【化２６】

改変体	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD25	1,3	58	N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T H307L S334P
pMD49 a	0,6	115	N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T **G223V** H307L S334P

（実施例２２．突然変異２２３Ｅを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性およびエキソ特異性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｄ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｋ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ１７１Ｇ１１と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性およびエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性および改善されたエキソ特異性を示した。

【０４３４】

【化２７】

改変体	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD25	1,3	58	N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T H307L S334P
SSM171 G11	3,0	113	N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T **G223E** H307L S334P

（実施例２３．突然変異Ｇ２２３Ｒを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性およびエキソ特異性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｄ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｒ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ１７３Ｂ６と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性およびエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性および改善されたエキソ特異性を示した。

【０４３５】

【化２８】

改変体	t½-80	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD25	1,3	58	N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T H307L S334P
SSM173 B6	1,5	76	N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T **G223R** H307L S334P

（実施例２４．突然変異Ｙ１４６Ｇを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性）

３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１４６Ｇ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ３８１と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性を示した。

【０４３６】

【化２９】

配列番号	識別名	突然変異	主鎖	t½-80	t½-85
15	SSM381	Y146G	pMD96	20	2.6
14	PMD96			6.0	1.4

（実施例２５．突然変異１５７Ｍを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性）

３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ２７９Ｂ１と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性を示した。

【０４３７】

【化３０】

配列番号	識別名	突然変異	主鎖	t½-80
16	PMD140	L157M	PMD96	7,6
13	PMD96			6,0

（実施例２６．突然変異１５８Ｔを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性）

３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１５８Ｔ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ２３７Ｐ２と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性を示した。

【０４３８】

【化３１】

配列番号	識別名	突然変異	主鎖	t½-80
17	PMD130	G158T	PMD96	8,0
13	PMD96			6,0

（実施例２７．突然変異１９８Ｗおよび／または２２９Ｐを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性）

３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、２２９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ３２５Ｆ３と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性を示した。

【０４３９】

３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、１９８Ｗ、２２３Ｅ、２２９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するｐＭＤ１２９と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性を示した。

【０４４０】

【化３２】

配列番号	識別名	突然変異	主鎖	t½-80	t½-85
20	pMD129	Y198W, S229P	pMD96		2,4
19	SSM325 F3	S229P	pMD96	7,9	1,8
14	pMD96			6,0	1,4

（実施例２８．突然変異Ｇ３０３ＥまたはＧ３０３Ｄを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強されたエキソ特異性）

３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ３４１Ａ９と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドをエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善されたエキソ特異性を示した。

【０４４１】

３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０３Ｄ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ３４１Ｇ１１と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドをエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善されたエキソ特異性を示した。

【０４４２】

【化３３】

配列番号	識別名	突然変異	主鎖	Betamyl/Phadebas
21	SSM341 A9	G303E	pMD96	256
22	SSM341 G11	G303D	pMD96	230
14	pMD96			179

（実施例２９．突然変異Ｈ３０６ＴまたはＨ３０６Ｇを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強されたエキソ特異性）

３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０６Ｔ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ３５０Ｂ１１と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドをエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善されたエキソ特異性を示した。

【０４４３】

３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１

７９Ｔ、２２３Ｅ、３０６Ｇ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ３５０Ｃ１２と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドをエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善されたエキソ特異性を示した。
【０４４４】
【化３４】

配列番号	識別名	突然変異	主鎖	Betamyl/Phadebas
23	SSM350 B11	H306T	pMD96	271
24	SSM350 C12	H306G	pMD96	195
14	pMD96			179

（実施例３０．突然変異Ａ３０９Ｐを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強されたエキソ特異性）
３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ３３２Ｑ４と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性を示した。
【０４４５】
【化３５】

配列番号	識別名	突然変異	主鎖	t½-80	t½-85
25	SSM332 Q4	A309P	pMD96	7.5	2,5
14	PMD96			6.0	1.4

（実施例３１．突然変異Ｒ３１６ＳまたはＲ３１６Ｐを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性）
３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３１６Ｓ、および３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ３６５Ｂ４と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性を示した。
【０４４６】
３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３１６Ｐ、および３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ３６５Ｆ４と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性を示した。
【０４４７】
【化３６】

配列番号	識別名	突然変異	主鎖	t½-80	t½- t½-85
26	SSM365 B4	R316S	pMD96	7.5	2.5
27	SSM365 F4	R316P	pMD96	7.1	2.0
14	PMD96			6.0	1.4

（実施例３２．突然変異Ｒ３５３Ｔを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性）

３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３３４Ｐ、および３５３Ｔでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ３６０Ｃ７と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性を示した。

【０４４８】

【化３７】

配列番号	識別名	突然変異	主鎖	t½-80	t½-85
28	SSM360 C7	R353T	pMD96	5.6	2.6
14	PMD96			6.0	1.4

（実施例３３．突然変異２６Ｅを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強されたエキソ特異性）

Ｎ２６Ｅ、Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＳＭ２１９Ｂ３と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドをエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善されたエキソ特異性を示した。

【０４４９】

【化３８】

改変体	t½-85	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD55		54	N33Y D34N G121F G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P
SSM219 B3		94	N26E N33Y D34N G121F G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P

半減期ｔ１／２－８５は、５０ｍＭのクエン酸ナトリウム、５ｍＭのＣａＣｌ$_2$、ｐＨ６．５のバッファーを用いてＰＤ－１０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いたサンプルのゲルろ過後に、実施例８にしたがって決定した。

【０４５０】

（実施例３４．突然変異７０Ｄを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強されたエキソ特異性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ７０Ｄ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ａ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＡＳ１４０１Ｌ１０と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドをエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善されたエキソ特異性を示した。

【０４５１】

【化３９】

改変体	t½-85	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD153		206	N33Y D34N G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P
SAS1401 L10		245	N33Y D34N **G70D** G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P

半減期ｔ１／２－８５は、５０ｍＭのクエン酸ナトリウム、５ｍＭのＣａＣｌ$_2$、ｐＨ６．５のバッファーを用いてＰＤ－１０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いたサンプルのゲルろ過後に、実施例８にしたがって決定した。

【０４５２】

（実施例３５．突然変異１４５Ｄを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性およびエキソ特異性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｎ１４５Ｄ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＳＡＳ１３８７Ｄ１６ｂｆと名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性およびエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性および改善されたエキソ特異性を示した。

【０４５３】

【化４０】

改変体	t½-85	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD153	12,3	206	N33Y D34N G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P
SAS1387 D16 bf	22,3	336	N33Y D34N G121F G134R A141P **N145D** Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P

半減期ｔ１／２－８５は、５０ｍＭのクエン酸ナトリウム、５ｍＭのＣａＣｌ$_2$、ｐＨ６．５のバッファーを用いてＰＤ－１０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いたサンプルのゲルろ過後に、実施例８にしたがって決定した。

【０４５４】

（実施例３６．突然変異１８８Ｈを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ７０Ｄ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｎ１４５Ｄ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ１８８Ｈ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ、Ｗ３３９Ｅでのアミノ酸突然変異を有するｐＭＤ２３６と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性を示した。

【０４５５】

【化４１】

改変体	t½-85	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD212 bf	12,2		N33Y D34N G70D G121F G134R A141P N145D Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P W339E
pMD236	16,1		N33Y D34N G70D G121F G134R A141P N145D Y146G I157L G158T S161A L178F A179T **G188H** G223E S229P H307L A309P S334P W339E

半減期ｔ１／２－８５は、５０ｍＭのクエン酸ナトリウム、５ｍＭのＣａＣｌ$_2$、ｐＨ６．５のバッファーを用いてＰＤ－１０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いたサンプルのゲルろ過後に、実施例８にしたがって決定した。

【０４５６】

（実施例３７．突然変異１８８Ｓを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強された熱安定性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ７０Ｄ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｎ１４５Ｄ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ１８８Ｓ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ、Ｗ３３９Ｅでのアミノ酸突然変異を有するｐＭＤ２３７ｂｆと名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドを熱安定性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善された熱安定性を示した。

【０４５７】

【化４２】

改変体	t½-85	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD212 bf	12,2		N33Y D34N G70D G121F G134R A141P N145D Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P W339E
pMD237 bf	12,6		N33Y D34N G70D G121F G134R A141P N145D Y146G I157L G158T S161A L178F A179T **G188S** G223E S229P H307L A309P S334P W339E

半減期ｔ１／２－８５は、５０ｍＭのクエン酸ナトリウム、５ｍＭのＣａＣｌ$_2$、ｐＨ６．５のバッファーを用いてＰＤ－１０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いたサンプルのゲルろ過後に、実施例８にしたがって決定した。

【０４５８】

（実施例３８．突然変異３３９Ａを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強されたエキソ特異性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ、Ｗ３３９Ａでのアミノ酸突然変異を有するＳＡＳ１３７９Ｏ１３と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドをエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善されたエキソ特異性を示した。

【０４５９】

【化４３】

改変体	t½-85	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD153		206	N33Y D34N G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P
SAS1379 O13		301	N33Y D34N G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P **W339A**

半減期ｔ１／２－８５は、５０ｍＭのクエン酸ナトリウム、５ｍＭのＣａＣｌ$_2$、ｐＨ６．５のバッファーを用いてＰＤ－１０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いたサンプルのゲルろ過後に、実施例８にしたがって決定した。

【０４６０】

（実施例３９．突然変異３３９Ｅを備えるＰＳ４改変体ポリペプチドの増強されたエキソ特異性）

Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｙ１４６Ｇ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ１５８Ｔ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｓ２２９Ｐ、Ｈ３０７Ｌ、Ａ３０９Ｐ、Ｓ３３４Ｐ、Ｗ３３９ＥでのアミノNo酸突然変異を有するＳＡＳ１３７９Ｏ９と名付けられたＰＳ４改変体ポリペプチドをエキソ特異性について試験した。このポリペプチドは、以下の表に示すように改善されたエキソ特異性を示した。

【０４６１】

【化４４】

改変体	t½-85	Betamyl/Phadebas	突然変異
pMD153		206	N33Y D34N G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P
SAS1379 O9		347	N33Y D34N G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P **W339E**

半減期ｔ１／２－８５は、５０ｍＭのクエン酸ナトリウム、５ｍＭのＣａＣｌ$_2$、ｐＨ６．５のバッファーを用いてＰＤ－１０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いたサンプルのゲルろ過後に、実施例８にしたがって決定した。

【０４６２】

（さらなる態様）

以下では、本発明のさらなる態様および実施形態を以下の番号付けした段落に記載する；本発明はこれらの態様を含むと理解されたい。

【０４６３】

段落Ａ１．非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチドから誘導可能であるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して１２１位におけるアミノ酸突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４６４】

段落Ａ２．段落Ａ１によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１２１位におけるアミノ酸突然変異が置換１２１Ｆ、１２１Ｙおよび／または１２１Ｗ、好ましくはＧ１２１Ｆ、Ｇ１２１Ｙおよび／またはＧ１２１Ｗを含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４６５】

段落Ａ３．段落Ａ１またはＡ２によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１６１および２２３からなる群から選択される位置で１つ以上のさらなる突然変異をさらに含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４６６】

段落Ａ４．段落Ａ３によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１つ以上のさらなる突然変異が１６１Ａ、２２３Ｅおよび２２３Ｋ、より好ましくはＳ１６１Ａ、Ｇ２２３Ｅおよび／またはＧ２２３Ｋからなる群から選択されるＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４６７】

段落Ａ５．先行段落ＡのいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１２１、１６１；１２１、２２３からなる群から選択される位置での突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４６８】

段落Ａ６．段落Ａ５によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１２１Ｆ／Ｙ／Ｗ、１６１Ａ；１２１Ｆ／Ｙ／Ｗ、２２３Ｅ／Ｋからなる群から選択される位置での突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４６９】

段落Ａ７．先行段落ＡのいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１２１、１６１および２２３からなる群から選択される位置での突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４７０】

段落Ａ８．先行段落ＡのいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１２１Ｆ／Ｙ／Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ／Ｋからなる群から選択される位置での突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４７１】

段落Ａ９．先行段落ＡのいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１３４、１４１、１５７、２２３、３０７、３３４位からなる群から選択される１または複数、好ましくは全部のさらなる突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４７２】

段落Ａ１０．先行段落ＡのいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、３３および３４のいずれかもしくは両方の位置での突然変異をさらに含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４７３】

段落Ａ１１．段落Ａ１０によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐからなる群から選択される１つまたは複数、好ましくは全部の置換、ならびに任意でＮ３３ＹおよびＤ３４Ｎの一方もしくは両方をさらに含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４７４】

段落Ａ１２．先行段落ＡのいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって：

（ａ）１２１位における突然変異、好ましくは１２１Ｄ、より好ましくはＧ１２１Ｄ；

（ｂ）１７８位における突然変異、好ましくは１７８Ｆ、より好ましくはＬ１７８Ｆ；

（ｃ）１７９位における突然変異、好ましくは１７９Ｔ、より好ましくはＡ１７９Ｔ；および／または

（ｄ）８７位における突然変異、好ましくは８７Ｓ、より好ましくはＧ８７Ｓを含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４７５】

段落Ｂ１．非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチドから誘導可能であるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して１６１位におけるアミノ酸突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４７６】

段落Ｂ２．段落Ｂ１によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１６１位における突然変異が置換１６１Ａ、好ましくはＳ１６１Ａを含むＰＳ４改変体ポリペプチド。
【０４７７】
段落Ｂ３．段落Ｂ１またはＢ２によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１２１および２２３からなる群から選択される位置で１つ以上のさらなる突然変異をさらに含むＰＳ４改変体ポリペプチド。
【０４７８】
段落Ｂ４．段落Ｂ３によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１つ以上のさらなる突然変異が１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗ、２２３Ｅおよび２２３Ｋ、より好ましくはＧ１２１Ｆ、Ｇ１２１Ｙ、Ｇ１２１Ｗ、Ｇ２２３Ｅおよび／またはＧ２２３Ｋからなる群から選択されるＰＳ４改変体ポリペプチド。
【０４７９】
段落Ｂ５．先行段落ＢのいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１２１、１６１；１６１、２２３からなる群から選択される位置での突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。
【０４８０】
段落Ｂ６．段落Ｂ５によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１２１Ｆ／Ｙ／Ｗ、１６１Ａ；１６１Ａ、２２３Ｅ／Ｋからなる群から選択される位置での突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。
【０４８１】
段落Ｂ７．先行段落Ｂのいずれかによるポリペプチドであって、１２１、１６１および２２３からなる群から選択される位置での突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。
【０４８２】
段落Ｂ８．先行段落Ｂのいずれかによるポリペプチドであって、１２１Ｆ／Ｙ／Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ／Ｋを含むＰＳ４改変体ポリペプチド。
【０４８３】
段落Ｂ９．先行段落Ｂのいずれかによるポリペプチドであって、１３４位、１４１位、１５７位、２２３位、３０７位、３３４位からなる群から選択される１または複数、好ましくは全部のさらなる突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。
【０４８４】
段落Ｂ１０．先行段落Ｂのいずれかによるポリペプチドであって、３３および３４のいずれかもしくは両方の位置での突然変異をさらに含むＰＳ４改変体ポリペプチド。
【０４８５】
段落Ｂ１１．段落Ｂ１０によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐからなる群から選択される１つ以上の置換、好ましくは全部、ならびに任意でＮ３３ＹおよびＤ３４Ｎの一方もしくは両方をさらに含むＰＳ４改変体ポリペプチド。
【０４８６】
段落Ｂ１２．先行段落Ｂのいずれかによるポリペプチドであって：
（ａ）１２１位における突然変異、好ましくは１２１Ｄ、より好ましくはＧ１２１Ｄ；
（ｂ）１７８位における突然変異、好ましくは１７８Ｆ、より好ましくはＬ１７８Ｆ；
（ｃ）１７９位における突然変異、好ましくは１７９Ｔ、より好ましくはＡ１７９Ｔ；および／または
（ｄ）８７位における突然変異、好ましくは８７Ｓ、より好ましくはＧ８７Ｓを含むＰＳ４改変体ポリペプチド。
【０４８７】
段落Ｃ１．非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチドから誘導可能であるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａ

ｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して２２３位におけるアミノ酸突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４８８】

段落Ｃ２．段落Ｃ１によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、２２３位における突然変異が置換２２３Ｅおよび／または２２３Ｋ、好ましくはＧ２２３Ｅおよび／またはＧ２２３Ｋを含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４８９】

段落Ｃ３．段落Ｃ１またはＣ２によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１２１および１６１からなる群から選択される位置で１つ以上のさらなる突然変異をさらに含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４９０】

段落Ｃ４．段落Ｃ３によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１つ以上のさらなる突然変異が１２１Ｆ、１２１Ｙ、１２１Ｗおよび１６１Ａ、より好ましくはＧ１２１Ｆ、Ｇ１２１Ｙ、Ｇ１２１Ｗおよび／またはＳ１６１Ａからなる群から選択されるＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４９１】

段落Ｃ５．先行段落ＣのいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１２１、２２３；１６１、２２３からなる群から選択される位置での突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４９２】

段落Ｃ６．段落Ｃ５によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１２１Ｆ／Ｙ／Ｗ、２２３Ｅ／Ｋ；１６１Ａ、２２３Ｅ／Ｋからなる群から選択される位置での突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４９３】

段落Ｃ７．先行段落ＣのいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１２１、１６１および２２３からなる群から選択される位置での突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４９４】

段落Ｃ８．先行段落ＣのいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、突然変異１２１Ｆ／Ｙ／Ｗ、１６１Ａ、２２３Ｅ／Ｋを含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４９５】

段落Ｃ９．先行段落ＣのいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１３４位、１４１位、１５７位、２２３位、３０７位、３３４位からなる群から選択される１または複数、好ましくは全部のさらなる突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４９６】

段落Ｃ１０．先行段落ＣのいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、３３および３４のいずれかもしくは両方の位置での突然変異をさらに含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４９７】

段落Ｃ１１．段落Ｃ１０によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐからなる群から選択される、１つ以上の置換、好ましくは全部、ならびに任意でＮ３３ＹおよびＤ３４Ｎの一方もしくは両方をさらに含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０４９８】

段落Ｃ１２．先行段落ＣのいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって：

（ａ）１２１位における突然変異、好ましくは１２１Ｄ、より好ましくはＧ１２１Ｄ；

（ｂ）１７８位における突然変異、好ましくは１７８Ｆ、より好ましくはＬ１７８Ｆ；

（ｃ）１７９位における突然変異、好ましくは１７９Ｔ、より好ましくはＡ１７９Ｔ；および／または

（ｄ）８７位における突然変異、好ましくは８７Ｓ、より好ましくはＧ８７Ｓを含むＰ

Ｓ４改変体ポリペプチド。

【０４９９】

段落Ｄ１．非マルトース生成エキソアミラーゼ活性を有する親ポリペプチドから誘導可能であるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、配列番号１に示したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａエキソアミラーゼ配列の位置の番号付けを参照して１４６、１５７、１５８、１９８、２２９、３０３、３０６、３０９、３１６および３５３からなる群から選択される１つ以上の位置でのアミノ酸突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５００】

段落Ｄ２．段落Ｄ１によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１４６Ｇ、１４６Ｍ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１５８Ａ、１５８Ｓ、１９８Ｗ、１９８Ｆ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、３１６Ｋ、３１６Ｑおよび３５３Ｔからなる群から選択されるアミノ酸突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５０１】

段落Ｄ３．段落Ｄ１によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、１４６Ｇ、１５７Ｍ、１５８Ｔ、１９８Ｗ、２２９Ｐ、３０３Ｅ、３０３Ｄ、３０６Ｔ、３０６Ｇ、３０９Ｐ、３１６Ｓ、３１６Ｐ、または３５３Ｔからなる群から選択されるアミノ酸突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５０２】

段落Ｄ４．段落Ｄ１によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、位置３３、３４、１２１、１３４、１４１、１５７、１６１、１７８、１７９、２２３、３０７および３３４からなる群から選択される、好ましくは３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐからなる群から選択される１つ以上のさらなる突然変異を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５０３】

段落Ｄ５．段落Ｄ１によるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、各々、以下：

（ａ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１４６Ｇ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐの突然変異を含み、好ましくは配列番号１５を有する；

（ｂ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐの突然変異を含み、好ましくは配列番号１６を有する；

（ｃ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１５８Ｔ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐの突然変異を含み、好ましくは配列番号１７を有する；

（ｄ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、１９８Ｗ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐの突然変異を含み、好ましくは配列番号１８を有する；

（ｅ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、２２９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐの突然変異を含み、好ましくは配列番号１９を有する；

（ｆ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、１９８Ｗ、２２３Ｅ、２２９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐの突然変異を含み、好ましくは配列番号２０を有する；

（ｇ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐの突然変異を含み、好ましくは配列番号２１を有する；

（ｈ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０３Ｄ、３０７Ｌおよび３３４Ｐの突然変異を含み、好まし

くは配列番号２２を有する；

（ｉ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０６Ｔ、３０７Ｌおよび３３４Ｐの突然変異を含み、好ましくは配列番号２３を有する；

（ｊ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０６Ｇ、３０７Ｌおよび３３４Ｐの突然変異を含み、好ましくは配列番号２４を有する；

（ｋ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐの突然変異を含み、好ましくは配列番号２５を有する；

（ｌ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３１６Ｓ、および３３４Ｐの突然変異を含み、好ましくは配列番号２６を有する；

（ｍ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３１６Ｐ、および３３４Ｐの突然変異を含み、好ましくは配列番号２７を有する；

（ｎ）３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３３４Ｐおよび３５３Ｔの突然変異を含み、好ましくは配列番号２８を有する；

ＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５０４】

段落１３．先行段落のいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、親ポリペプチドが非マルトース生成エキソアミラーゼ、好ましくはグルカン１，４－α－マルトテトラヒドロラーゼ（ＥＣ３．２．１．６０）を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５０５】

段落１４．先行段落のいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、親ポリペプチドがシュードモナス種、好ましくはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａもしくはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉであるか、またはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａもしくはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉから誘導可能である、ＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５０６】

段落１５．先行段落のいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、親ポリペプチドが配列番号１もしくは配列番号５に示した配列を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ由来エキソアミラーゼ由来の非マルトース生成エキソアミラーゼであるＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５０７】

段落１６．先行段落Ａ１～Ａ１２、Ｂ１～Ｂ１２、Ｃ１～Ｃ１２、Ｄ１～Ｄ５、１３および１４のいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、親ポリペプチドが配列番号７もしくは配列番号１１に示した配列を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ由来の非マルトース生成エキソアミラーゼであるＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５０８】

段落１７．先行段落のいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、本明細書、段落または図面に記載の配列を含むＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５０９】

段落１８．先行段落のいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、同一条件下で試験した場合に親ポリペプチドもしくは野生型ポリペプチドと比較して高い熱安定性を有するＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５１０】

段落１９．先行段落のいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、好ましくは６０℃での半減期（ｔ１／２）が、親ポリペプチドもしくは野生型ポリペプチドと比較し

て、１５％以上、好ましくは５０％以上、最も好ましくは１００％以上増加させられたＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５１１】

段落２０．先行段落のいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、同一条件下で試験した場合に親ポリペプチドもしくは野生型ポリペプチドと比較して高いエキソ特異性を有するＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５１２】

段落２１．先行段落のいずれかによるＰＳ４改変体ポリペプチドであって、親ポリペプチドもしくは野生型ポリペプチドと比較して、１０％以上、好ましくは２０％以上、好ましくは５０％以上のエキソ特異性を有するＰＳ４改変体ポリペプチド。

【０５１３】

段落２２．先行段落のいずれかに記載のＰＳ４改変体ポリペプチドの食品添加物としての使用。

【０５１４】

段落２３．デンプンと段落Ａ１～Ａ１２、Ｂ１～Ｂ１２、Ｃ１～Ｃ１２、Ｄ１～Ｄ５および１３～２１のいずれかに記載したＰＳ４改変体ポリペプチドとを接触させる工程と該ポリペプチドにデンプンから１つ以上の直鎖状生成物を生成させる工程とを包含する、デンプンを処理するプロセス。

【０５１５】

段落２４．食品を調製する際の段落Ａ１～Ａ１２、Ｂ１～Ｂ１２、Ｃ１～Ｃ１２、Ｄ１～Ｄ５および１３～２１のいずれかに記載のＰＳ４改変体ポリペプチドの使用。

【０５１６】

段落２５．段落Ａ１～Ａ１２、Ｂ１～Ｂ１２、Ｃ１～Ｃ１２、Ｄ１～Ｄ５および１３～２１のいずれかに記載のポリペプチドを食品成分と混合する工程を包含する、食品を調製するプロセス。

【０５１７】

段落２６．食品が生地もしくは生地製品、好ましくは処理された生地製品を含む、段落２４による使用、または段落２５によるプロセス。

【０５１８】

段落２７．食品がベーカリー製品である、段落２４～２６のいずれかによる使用またはプロセス。

【０５１９】

段落２８．ベーカリー製品を製造するためのプロセスであって：（ａ）デンプン媒質を提供する工程と；（ｂ）デンプン媒質に段落Ａ１～Ａ１２、Ｂ１～Ｂ１２、Ｃ１～Ｃ１２、Ｄ１～Ｄ５および１３～２１のいずれかに記載のＰＳ４改変体ポリペプチドを添加する工程と；（ｃ）ベーカリー製品を製造するために工程（ｂ）中または後にデンプン媒質に熱を加える工程と、を包含するプロセス。

【０５２０】

段落２９．段落２４～２８のいずれかによるプロセスによって得られる食品、生地製品またはベーカリー製品。

【０５２１】

段落３０．生地用の改善剤組成物であって、段落Ａ１～Ａ１２、Ｂ１～Ｂ１２、Ｃ１～Ｃ１２、Ｄ１～Ｄ５および１３～２１のいずれかに記載したＰＳ４改変体ポリペプチド、および少なくとも１つのさらなる生地成分もしくは生地添加物を含む改善剤組成物。

【０５２２】

段落３１．粉および段落１～２１のいずれかに記載のＰＳ４改変体ポリペプチドを含有する組成物。

【０５２３】

段落３２．生地製品において生地製品の硬化を遅延もしくは減少させるため、好ましくは有害な老化を遅延もしくは減少させるための、段落Ａ１～Ａ１２、Ｂ１～Ｂ１２、Ｃ１

～Ｃ１２、Ｄ１～Ｄ５および１３～２１のいずれかに記載のＰＳ４改変体ポリペプチドの使用。
【０５２４】
段落３３．任意の先行段落に記載のＰＳ４改変体ポリペプチドと、Ｎｏｖａｍｙｌ、またはマルトース生成αアミラーゼ活性を有するその改変体、ホモログ、または突然変異体との組み合わせ。
【０５２５】
段落３４．先行段落のいずれかによる用途のための段落３３による組み合わせの使用。
【０５２６】
段落３５．段落３４による組み合わせを用いた処理によって製造された食品。
【０５２７】
段落３６．段落Ａ１～Ａ１２、Ｂ１～Ｂ１２、Ｃ１～Ｃ１２、Ｄ１～Ｄ５および１３～２１のいずれかに記載のＰＳ４改変体ポリペプチドを含有する食品添加物。
【０５２８】
（参考文献）
【０５２９】
【化４５】
Penninga, D., van der Veen, B.A., Knegtel, R.M., van Hijum, S.A., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkstra, B.W., Dijkhuizen, L. (1996). The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus circulans strain 251. J.Biol.Chem. *271*, 32777-32784.

Sambrook J, F.E.M.T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第２版 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

Zhou,J.H., Baba,T., Takano,T., Kobayashi,S., Arai,Y. (1989). Nucleotide sequence of the maltotetraohydrolase gene from Pseudomonas saccharophila. FEBS Lett. *255*, 37-41.

本明細書に言及した特許出願および特許の各々、および前記特許出願および特許の各々の係属中も含む上記の特許出願および特許の各々に言及もしくは参照された各文書（「特許出願に言及された文書」）、ならびに前記特許出願および特許の各々および特許出願に言及された文書のいずれかに言及もしくは参照された任意の製品の製造業者の取扱説明書もしくはカタログは、本明細書に参考として援用される。さらに、本明細書に言及した全文書、および本明細書に言及した文書内で言及もしくは参照された全文書、ならびに本明細書に言及もしくは参照された任意の製品についての任意の製造業者の取扱説明書もしくはカタログは、本明細書に参考として援用される。
【０５３０】
本発明に記載した方法およびシステムの様々な改変および変形は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、当業者に理解される。本発明を特定の好ましい実施形態に結び付けて記載してきたが、特許請求される本発明はそのような特定の実施形態に過度に限定すべきではないと理解すべきである。実際に、分子生物学または関連分野の当業者には明白である、本発明を実施するために記載した様式の様々な改変は、本発明の範囲内に含まれることが意図されている。
【０５３１】
（配列表）
（配列番号１）
Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列に由来するＰＳ４参照配列。
【０５３２】

【化４６】

```
  1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APNDWYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
 61 RDFSSWTDGG KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 GYPDKEINLP AGQGFWRNDC ADPGNYPNDC DDGDRFIGGE SDLNTGHPQI YGMFRDELAN
181 LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKGPSEYPSW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHHWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWSHMYDWG YGDFIRQLIQ VRRTAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGS
421 GDGGGNDGGE GGLVNVNFRC DNGVTQMGDS VYAVGNVSQL GNWSPASAVR LTDTSSYPTW
481 KGSIALPDGQ NVEWKCLIRN EADATLVRQW QSGGNNQVQA AAGASTSGSF
```

（配列番号２）

ＰＳａｃ－Ｄ３４配列；１１の置換およびデンプン結合ドメインの欠失を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５３３】

【化４７】

```
  1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
 61 RDFSSWTDPG KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 DYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRFLGGE SDLNTGHPQI YGMFRDEFTN
181 LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKAPSEYPSW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ VRRTAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGS
421 GDGGGNDGG
```

（配列番号３）

ＰＳａｃ－Ｄ２０配列；１３の置換およびデンプン結合ドメインの欠失を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５３４】

【化４８】

```
  1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
 61 RDFSSWTDPG RSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 DYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRFLGGE SDLNTGHPQI YGMFRDEFTN
181 LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKAPSEYPSW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGEFIRQLIQ VRRTAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGS
421 GDGGGNDGG
```

（配列番号４）

ＰＳａｃ－Ｄ１４配列；１４の置換およびデンプン結合ドメインの欠失を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５３５】

【化４９】

```
  1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
 61 RDFSSWTDPG RSGGGEGYFW HDFNKNSRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 DYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRFLGGE SDLNTGHPQI YGMFRDEFTN
181 LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKAPSEYPSW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGEFIRQLIQ VRRTAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGS
421 GDGGGNDGG
```

（配列番号５）

Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ由来グルカン１，４－α－マ

ルトテトラヒドロラーゼ前駆物質（ＥＣ３．２．１．６０）（Ｇ４－アミラーゼ）（マルトテトラオース生成アミラーゼ）（エキソーマルトテトラヒドロラーゼ）（マルトテトラオース生成エキソアミラーゼ）。ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ２２９６３。

【０５３６】

【化５０】

```
MSHILRAAVL AAVLLPFPAL ADQAGKSPAG VRYHGGDEII LQGFHWNVVR EAPNDWYNIL
RQQASTIAAD GFSAIWMPVP WRDFSSWTDG GKSGGGEGYF WHDFNKNGRY GSDAQLRQAA
GALGGAGVKV LYDVVPNHMN RGYPDKEINL PAGQGFWRND CADPGNYPND CDDGDRFIGG
ESDLNTGHPQ IYGMFRDELA NLRSGYGAGG FRFDFVRGYA PERVDSWMSD SADSSFCVGE
LWKGPSEYPS WDWRNTASWQ QIIKDWSDRA KCPVFDFALK ERMQNGSVAD WKHGLNGNPD
PRWREVAVTF VDNHDTGYSP GQNGGQHHWA LQDGLIRQAY AYILTSPGTP VVYWSHMYDW
GYGDFIRQLI QVRRTAGVRA DSAISFHSGY SGLVATVSGS QQTLVVALNS DLANPGQVAS
GSFSEAVNAS NGQVRVWRSG SGDGGGNDGG EGGLVNVNFR CDNGVTQMGD SVYAVGNVSQ
LGNWSPASAV RLTDTSSYPT WKGSIALPDG QNVEWKCLIR NEADATLVRQ WQSGGNNQVQ
AAAGASTSGS F
```

（配列番号６）

マルトテトラヒドロラーゼ（ＥＣ番号＝３．２．１．６０）をコードするＰ．ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａ由来ｍｔａ遺伝子。ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｘ１６７３２。

【０５３７】

【化５１】

gatcggcgta ggtttcgcat tcgttgccca ggcgatattt cgccggtgcg ccagcagcct
ggaagcaggc ctggtcgccg ccgccggccg tggcgccgac gcccgaacgc agatagccgt
ggaaatcgac cgccagggcc gggccgccga ccagcagggc ggcaagcagg caggcgggtt
ttaggacgaa caggggtgc gcggtgtgct tcatgacgag gtccttgttt ttcttgttaa
tgccgaatcg atcacgcctt cgctgcgtgt cgcagggcgc agctcggtgg cgaaagcctc
ggggatggct ccgctggcgg catcctcccg accagagatt tcgctggcgc agctcgaggg
cgtaatcagg atgagtgcgg cgtaatccct ggggtggggc tacgcccggc agggcgcaga
tgattgccag gggccttcgg cctggccact acgccgcctg caactgggcg ggggaggttg
gtggtcgggg cgtgcagggg cagcctgcgg gtgccggtcg aagacccggc cggcgttcat
cctcgtccgg cggccttgcc gtaggatacc cgaacaagca caagaaccgg agtattgcga
tgagccacat cctgcgtgcc gccgtattgg cggcggtcct gctgccgttt cccgcactgg
ccgatcaggc cggcaagagc ccggccgggg tgcgctacca cggcggcgac gaaatcatcc
tccagggctt ccactggaac gtcgtccgcg aagcgcccaa cgactggtac aacatcctcc
gccaacaggc ctcgacgatc gcggccgacg gcttctcggc aatctggatg ccggtgccct
ggcgtgactt ctccagctgg accgacggcg gcaagtccgg cggcggcgaa ggctacttct
ggcacgactt caacaagaac ggccgctacg gcagcgacgc ccagctgcgc caggccgccg
gcgcactcgg tggcgccggg gtgaaggtgc tctacgatgt ggtgcccaat cacatgaacc
gcggctaccc ggacaaggag atcaacctgc cggccggcca gggcttctgg cgcaacgact
gcgccgaccc gggcaactac cccaacgact gcgacgacgg tgaccgcttc atcggcggcg
agtcggacct gaacaccggc catccgcaga tttacggcat gtttcgcgac gagcttgcca
acctgcgcag cggctacggc gccggcggct tccgcttcga cttcgttcgc ggctatgcgc
ccgagcgggt cgacagctgg atgagcgaca gcgccgacag cagcttctgc gttggcgagc
tgtggaaagg cccttctgaa tatccgagct gggactggcg caacacggcg agctggcagc
agatcatcaa ggactggtcc gaccgggcca agtgcccggt gttcgacttc gctctcaagg
agcgcatgca gaacggctcg gtcgccgact ggaagcatgg cctcaatggc aaccccgacc
cgcgctggcg cgaggtggcg gtgaccttcg tcgacaacca cgacaccggc tattcgcccg
ggcagaacgg cggccagcac cactgggcgc tgcaggacgg gctgatccgc caggcctacg
cctacatcct caccagcccg ggcacgccgg tggtgtactg gtcgcacatg tacgactggg
gctacggcga cttcatccgc cagctgatcc aggtgcggcg caccgccggc gtgcgcgccg
attcggcgat cagcttccat agcggctaca gcggtctggt cgctaccgtc agcggcagcc
agcagaccct ggtggtggcg ctcaactccg atctggccaa ccccggccag gttgccagcg
gcagcttcag cgaggcggtc aacgccagca acggccaggt gcgcgtctgg cgcagcggta
gcggcgatgg cggcgggaat gacggcggcg agggtggctt ggtcaatgtg aactttcgct
gcgacaacgg cgtgacgcag atgggcgaca gcgtctacgc ggtgggcaac gtcagccagc
tcggcaactg gagcccggcc tccgcggtac ggctgaccga caccagcagc tatccgacct
ggaagggcag catcgccctg cctgacggtc agaacgtgga atggaagtgc ctgatccgca
acgaggcgga cgcgacgctg gtgcgtcagt ggcaatcggg cggcaacaac caggtccagg
ccgccgccgg cgcgagcacc agcggctcgt tctgacgaca tgcccgcccg gcctcggcta
cgcctacgcc gggcggctcc tcccgaccca gggtgggcag ggaggaggcc ggcgacgggc
cgggccgccg atgctggcac gacaaccata aaagccttcg cgctgcgctg tcgtatcagg
agctgttcat gttggcccag acccgctcga ccccttttccg gcttggcttc ctggcccggc
tgtacctgct gatcgccgca ctggtggcct tgctgatgct ggtagccggc accagcctgg
ttgccatcgg ccgcctgcaa ggcaatgccg agcaaatctc gtcgaccgcg tcgcgtctgc
tggtcagcga gagcttcttc ggtacgttgc agagcctgac gcagaacctg tccgacgccc
tggccgagga ccggcctgac cagctcgacg gctatgtcgg ccggcatcgc acgctgcagg
accaggccct cgagctgttc gcccagctgg agcgggtgac gccggcacat gccgagacca
agcaagcctg gcggcgctgt tgccggagct cgaccgccgc agcctggcgc tgatcgatgc
gcacgcgacc tgctcgcgcg tggggcgcaa cgccgtcgcc tgcgcgatct gcagctgcag
ttctcgcggc tcaagcagga cctgctgcag gcgcagttcg tgacgggcga cgagctggtc
gcctattcca tcaagcagtt catcatcccg ctcgagcagg tcgagcgctg ctgttcgatg
ccatcggcgt gtcttcgatc aaggcactcg atgaagcggg tgcgcagatc

（配列番号７）

Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ由来マルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列に由来するＰＳ４参照配列。

【０５３８】

【化５２】

1 DQAGKSPNAV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APNDWYNILR QQAATIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWSDGS KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAS ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 GYPDKEINLP AGQGFWRNDC ADPGNYPNDC DDGDRFIGGD ADLNTGHPQV YGMFRDEFTN
181 LRSQYGAGGF RFDFVRGYAP ERVNSWMTDS ADNSFCVGEL WKGPSEYPNW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVFDFALKE RMQNGSIADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHHWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWSHMYDWG YGDFIRQLIQ VRRAAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LGNPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGT
421 GSGGGEPGAL VSVSFRCDNG ATQMGDSVYA VGNVSQLGNW SPAAALRLTD TSGYPTWKGS
481 IALPAGQNEE WKCLIRNEAN ATQVRQWQGG ANNSLTPSEG ATTVGRL

（配列番号８）

ＰＳｔｕ－Ｄ３４配列；９の置換を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ由来マルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５３９】

【化５３】

1 DQAGKSPNAV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQAATIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWSDPS KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAS ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 DYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRFLGGD ADLNTGHPQV YGMFRDEFTN
181 LRSQYGAGGF RFDFVRGYAP ERVNSWMTDS ADNSFCVGEL WKAPSEYPNW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVFDFALKE RMQNGSIADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ VRRAAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LGNPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGT
421 GSGGGEPGAL VSVSFRCDNG ATQMGDSVYA VGNVSQLGNW SPAAALRLTD TSGYPTWKGS
481 IALPAGQNEE WKCLIRNEAN ATQVRQWQGG ANNSLTPSEG ATTVGRL

（配列番号９）

ＰＳｔｕ－Ｄ２０配列；１１の置換を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ由来マルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５４０】

【化５４】

1 DQAGKSPNAV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQAATIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWSDPS RSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAS ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 DYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRFLGGD ADLNTGHPQV YGMFRDEFTN
181 LRSQYGAGGF RFDFVRGYAP ERVNSWMTDS ADNSFCVGEL WKAPSEYPNW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVFDFALKE RMQNGSIADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGEFIRQLIQ VRRAAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LGNPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGT
421 GSGGGEPGAL VSVSFRCDNG ATQMGDSVYA VGNVSQLGNW SPAAALRLTD TSGYPTWKGS
481 IALPAGQNEE WKCLIRNEAN ATQVRQWQGG ANNSLTPSEG ATTVGRL

（配列番号１０）

ＰＳｔｕ－Ｄ１４配列；１２の置換を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ由来マルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５４１】

【化５５】

1 DQAGKSPNAV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQAATIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWSDPS RSGGGEGYFW HDFNKNSRYG SDAQLRQAAS ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 DYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRFLGGD ADLNTGHPQV YGMFRDEFTN
181 LRSQYGAGGF RFDFVRGYAP ERVNSWMTDS ADNSFCVGEL WKAPSEYPNW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVFDFALKE RMQNGSIADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGEFIRQLIQ VRRAAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LGNPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGT
421 GSGGGEPGAL VSVSFRCDNG ATQMGDSVYA VGNVSQLGNW SPAAALRLTD TSGYPTWKGS
481 IALPAGQNEE WKCLIRNEAN ATQVRQWQGG ANNSLTPSEG ATTVGRL

（配列番号１１）

Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｚｅｒｉ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｅｒｆｅｃｔ

ｏｍａｒｉｎａ）由来グルカン１，４－α－マルトテトラヒドロラーゼ前駆物質（ＥＣ３．２．１．６０）（Ｇ４－アミラーゼ）（マルトテトラオース生成アミラーゼ）（エキソ－マルトテトラヒドロラーゼ）（マルトテトラオース生成エキソアミラーゼ）。ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴアクセッション番号Ｐ１３５０７。

【０５４２】

【化５６】

```
MSHILRAAVL AAMLLPLPSM ADQAGKSPNA VRYHGGDEII LQGFHWNVVR EAPNDWYNIL
RQQAATIAAD GFSAIWMPVP WRDFSSWSDG SKSGGGEGYF WHDFNKNGRY GSDAQLRQAA
SALGGAGVKV LYDVVPNHMN RGYPDKEINL PAGQGFWRND CADPGNYPND CDDGDRFIGG
DADLNTGHPQ VYGMFRDEFT NLRSQYGAGG FRFDFVRGYA PERVNSWMTD SADNSFCVGE
LWKGPSEYPN WDWRNTASWQ QIIKDWSDRA KCPVFDFALK ERMQNGSIAD WKHGLNGNPD
PRWREVAVTF VDNHDTGYSP GQNGGQHHWA LQDGLIRQAY AYILTSPGTP VVYWSHMYDW
GYGDFIRQLI QVRRAAGVRA DSAISFHSGY SGLVATVSGS QQTLVVALNS DLGNPGQVAS
GSFSEAVNAS NGQVRVWRSG TGSGGGEPGA LVSVSFRCDN GATQMGDSVY AVGNVSQLGN
WSPAAALRLT DTSGYPTWKG SIALPAGQNE EWKCLIRNEA NATQVRQWQG GANNSLTPSE
GATTVGRL
```

（配列番号１２）

Ｐ．ｓｔｕｚｅｒｉ由来マルトテトラオース生成アミラーゼ（ａｍｙＰ）遺伝子、完全コドン。ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｍ２４５１６。

【０５４３】

【化５７】

```
   1 gatcggcctt tacggaaagt gatagagctt ctcttccggc aaactttgtt ccccagtgac
  61 agagggttag tatcggatcg cttcctcttt gggtttggta gatcaggagc gccgagagca
 121 ggatgaaatc ctgcggccag aaggtcgcgc cgaagatgtg gaactgctgc tggccgagat
 181 ccggccggcg ttcatcctcg tccggcggcc ttgccgccag ctacccgaac aagcacaaga
 241 accggagtat tgcgatgagc cacatcctgc gagccgccgt attggcggcg atgcctgcgc
 301 cgttgccgtc catggccgat caggccggca agagccccaa cgctgtgcgc taccacggcg
 361 gcgacgaaat cattctccag ggctttcact ggaacgtcgt ccgcgaagcg cccaacgact
 421 ggtacaacat cctgcgccag caggccgcga ccatcgccgc cgacggcttc tcggcgatct
 481 ggatgccggt gccctggcgc gacttctcca gctggagcga cggcagcaag tccggcggcg
 541 gtgaaggcta cttctggcac gacttcaaca agaacggccg ctatggcagt gacgcccagc
 601 tgcgtcaggc cgccagcgcg ctcggtggcg ccggcgtgaa agtgctttac gacgtggtgc
 661 ccaaccacat gaaccgtggc tatccggaca aggagatcaa cctcccggcc ggccagggct
 721 tctggcgcaa cgactgcgcc gacccgggca actaccccaa tgattgcgac gacggcgacc
 781 gcttcatcgg cggcgatgcg gacctcaaca ccggccaccc gcaggtctac ggcatgttcc
 841 gcgatgaatt caccaacctg cgcagtcagt acggtgccgg cggcttccgc ttcgactttg
 901 ttcggggcta tgcgccggag cgggtcaaca gctggatgac cgatagcgcc gacaacagct
 961 tctgcgtcgg cgaactgtgg aaaggcccct ctgagtaccc gaactgggac tggcgcaaca
1021 ccgccagctg gcagcagatc atcaaggact ggtccgaccg ggccaagtgc ccggtgttcg
1081 acttcgccct caaggaacgc atgcagaacg ctcgatcgcc gactggaagc acgcctgaac
1141 ggcaatcccg acccgcgtgg cgcgaggtgg cggtgacctt cgtcgacaac cacgacaccg
1201 gctactcgcc cgggcagaac ggtgggcagc accactgggc tctgcaggac gggctgatcc
1261 gccaggccta cgcctacatc ctcaccagcc ccggtacgcc ggtggtgtac tggtcgcaca
1321 tgtacgactg ggttacggc gacttcatcc gtcagctgat ccaggtgcgt cgcgccgccg
1381 gcgtgcgcgc cgattcggcg atcagcttcc acagcggcta cagcggtctg gtcgccaccg
1441 tcagcggcag ccagcagacc ctggtggtgg cgctcaactc cgacctgggc aatcccggcc
1501 aggtggccag cggcagcttc agcgaggcgg tcaacgccag caacggccag gtgcgcgtgt
1561 ggcgtagcgg cacgggcagc ggtggcggtg aacccggcgc tctggtcagt gtgagtttcc
1621 gctgcgacaa cggcgcgacg cagatgggcg acagcgtcta cgcggtcggc aacgtcagcc
1681 agctcggtaa ctggagcccg gccgcggcgt tgcgcctgac cgacaccagc ggctacccga
1741 cctggaaggg cagcattgcc ttgcctgccg gccagaacga ggaatggaaa tgcctgatcc
1801 gcaacgaggc caacgccacc caggtgcggc aatggcaggg cggggcaaac aacagcctga
1861 cgccgagcga gggcgccacc accgtcggcc ggctctagcc cgggcggcaa ctcggccgtc
1921 tcgcggatgt gaggcggctg gtctcggcgg cggtatcgtt gcgctggggg cggggccgcc
1981 gttcacgcgc cctgctatcg ctagttttcg gcgctccgcg catcggccag ttgccagcga
2041 atcgcctgcg cttcggcctg gtgcaggtcg tcgagcagcg ct
```

（配列番号１３）

ｐＭＤ５５配列；１１の置換（Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｇ２２３Ａ、Ｈ３０７Ｌ、Ｓ３３４Ｐ、Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９ＴおよびＧ１２１Ｆ）およびデンプン結合ドメインの欠失を伴うＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５４４】

【化５８】

```
  1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
 61 RDFSSWTDPG KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRFLGGE SDLNTGHPQI YGMFRDEFTN
181 LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKAPSEYPSW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ VRRTAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGS
421 GDGGGNDGG
```

（配列番号１４）

ＰＭＤ９６配列；Ｎ３３Ｙ、Ｄ３４Ｎ、Ｇ１２１Ｆ、Ｇ１３４Ｒ、Ａ１４１Ｐ、Ｉ１５７Ｌ、Ｓ１６１Ａ、Ｌ１７８Ｆ、Ａ１７９Ｔ、Ｇ２２３Ｅ、Ｈ３０７ＬおよびＳ３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５４５】

【化５９】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号１５）

ＳＳＭ３８１配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１４６Ｇ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５４６】

【化６０】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGN**G**PNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号１６）

ＳＳＭ２７９Ｂ１配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｍ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５４７】

【化６１】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRF**M**GGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号１７）

ＳＳＭ２３７Ｐ２配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１５８Ｔ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然

変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５４８】

【化６２】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLTGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号１８）

３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、１９８Ｗ、２２３Ｅ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでのアミノ酸突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５４９】

【化６３】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGW
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号１９）

ＳＳＭ３２５Ｆ３配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、２２９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５５０】

【化６４】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPPWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号２０）

ｐＭＤ１２９配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、１９８Ｗ、２２３Ｅ、２２９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５５１】

【化６５】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGW
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPPWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号２１）

ＳＳＭ３４１Ａ９配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０３Ｅ、３０７Lおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５５２】

【化６６】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQN**E**GQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号２２）

ＳＳＭ３４１Ｇ１１配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０３Ｄ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５５３】

【化６７】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQN**D**GQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号２３）

ＳＳＭ３５０Ｂ１１配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０６Ｔ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５５４】

【化６８】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQ**T**LWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号２４）

ＳＳＭ３５０Ｃ１２配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０６Ｇ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５５５】

【化６９】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQ**G**LWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号２５）

ＳＳＭ３３２Ｑ４配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０９Ｐ、３０７Ｌおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５５６】

【化７０】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLW**P**LQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号２６）

ＳＳＭ３６５Ｂ４配列；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３１６Ｓおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５５７】

【化７１】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLI**S**QAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号２７）

ＳＳＭ３６５Ｆ４；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３１６Ｐおよび３３４Ｐでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラーゼのアミノ酸配列。

【０５５８】

【化７２】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLI**P**QAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

（配列番号２８）

ＳＳＭ３６０Ｃ７；３３Ｙ、３４Ｎ、１２１Ｆ、１３４Ｒ、１４１Ｐ、１５７Ｌ、１６１Ａ、１７８Ｆ、１７９Ｔ、２２３Ｅ、３０７Ｌ、３３４Ｐおよび３５３Ｔでの突然変異を有するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓａｃｃｈａｒｏｐｈｉｌｉａマルトテトラヒドロラ

ーゼのアミノ酸配列。

【０５５９】

【化７３】

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVFDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVR**T**TAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

【配列表】

2012070751000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ２３Ｌ	*1/30*	*(2006.01)*	Ａ２３Ｌ	1/30	Ｚ	４Ｂ０５０
Ａ２１Ｄ	*2/26*	*(2006.01)*	Ａ２１Ｄ	2/26		４Ｂ０６５
Ａ２１Ｄ	*13/00*	*(2006.01)*	Ａ２１Ｄ	13/00		
Ａ２３Ｌ	*1/03*	*(2006.01)*	Ａ２３Ｌ	1/03		
Ａ２３Ｋ	*1/16*	*(2006.01)*	Ａ２３Ｋ	1/16	３０３Ｆ	

(31)優先権主張番号　10/886,527
(32)優先日　平成16年7月7日(2004.7.7)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/612,407
(32)優先日　平成16年9月22日(2004.9.22)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　10/947,612
(32)優先日　平成16年9月22日(2004.9.22)
(33)優先権主張国　米国(US)

(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　カスパー　トゥーネ　バーグ
デンマーク国　ディーコー－２６５０　フヴィドフレ，　ホルムルントスウェク　２１アー
(72)発明者　パトリック　エム．　エフ．　デルクス
デンマーク国　ディーコー－３０８０　ティコブ，　ソゴースウェイ　１
(72)発明者　キャロル　フィオレシ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０６０，　レッドウッド　シティ，　ノーサンバーランド　アベニュー　４０８
(72)発明者　ギースベルト　ゲリッツェ
オランダ国　エヌエル－２９９５　ティーシー　ヘーアヤンスダム，　クライスベスパド　２
(72)発明者　アーニャ　ヘミンゲン　ケレースミス
デンマーク国　ディーコー－２８６０　ソボル，　ソボル　ホウェガート　９４，　３．ティーエイチ．
(72)発明者　カルステン　マティアス　クラーフ
デンマーク国　ディーコー－８２６０　フィビー　ジェイ，　ラーフイトフテン　９
(72)発明者　リュー　ウェイ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４３０６，　パロ　アルト，　アルマ　ストリート　３３５－エー，　アパートメント　２２２
(72)発明者　アンドリュー　ショー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４１０９，　サンフランシスコ，　ハイド　ストリート　２５６０
(72)発明者　ボー　シュパンゲ　ソレンセン
デンマーク国　ディーコー－８６６０　スカンデルボー，　フェンリスウェイ　１５
(72)発明者　シャルロッテ　レフダール　トゥダール
デンマーク国　ディーコー－２６７０　グレーフェ，　ホルメオース　５１

Ｆターム(参考) 2B150 DC23
4B018 LB01 MD34 ME02 MF12 MF13
4B024 AA05 BA12 BA13 BA77 CA01 CA09 CA11 CA20 DA05 DA11

DA12 GA11 HA01 HA11
4B032 DB01 DB15 DK51 DL08 DP08
4B035 LC05 LG51 LK10 LP21
4B050 CC04 CC05 DD02 LL02
4B065 AA01X AA41X AA41Y AA60X AB01 AC14 BA01 CA31 CA32 CA41
CA42 CA43

【外国語明細書】
2012070751000001.pdf